



**Sheila Ferreira Lemos**

Licenciada em Engenharia Alimentar

**Avaliação da biodisponibilidade de compostos  
antioxidantes em variedades de maçã produzidas em  
Portugal.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão – FCT/UNL

Arguente: Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues – FCM/UNL

Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte – FCT/UNL



**Sheila Ferreira Lemos**

Licenciada em Engenharia Alimentar

**Avaliação da biodisponibilidade de compostos  
antioxidantes em variedades de maçã produzidas em  
Portugal.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,  
Professora Auxiliar, FCT/UNL



Setembro 2013

## **Direitos de Cópia/Copyright – Sheila Ferreira Lemos, FCT-UNL, UNL**

*“Avaliação da Biodisponibilidade de compostos antioxidante em variedades de maçã produzidas em Portugal.”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar.*

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

Agradeço primordialmente ao meu Criador, por ter proporcionado-me a oportunidade de realizar este trabalho que trará muito aprendizado em minha vida profissional.

Não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua elaboração e conclusão, tendo sido a sua colaboração e apoio imprescindíveis.

Agradeço à Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora do Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, pelo seu profissionalismo e pela simpatia com que sempre nos recebeu.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Paula Duarte pela orientação e disponibilidade para todas as dúvidas e crises, por conseguir sempre encontrar as melhores soluções para os problemas, pelo apoio e conselhos, expressando também a minha admiração pelo seu esforço em proporcionar sempre as melhores condições materiais e humanas possíveis para o desenvolvimento do trabalho experimental.

Agradeço a minha família que mesmo distante sempre esteve apoiando-me de todas as formas para a concretização deste trabalho. A minha mãe, meus irmãos, e meus sogros que são peças fundamentais em meu crescimento pessoal e profissional. Em especial ao meu companheiro Tiago que sempre foi meu melhor amigo, dando-me forças a cada dia visando o sucesso futuro.

À minha colega de trabalho, Anaísa Pereira, que sempre esteve presente em uma parte tão importante, o trabalho laboratorial, partilhando resultados bons e maus, vencendo o cansaço de cada dia. Agradeço pela sua boa disposição, ajuda e presença amiga constante em todos os momentos.

A todos os frequentadores habituais do laboratório 145 pelo bom acolhimento, nomeadamente à Sara, sempre com um bom humor contagiante, e pela boa vontade de sempre estar disponível para ajudar no que fosse possível. À D. Rita e à D. Rosa, que nos prestaram o melhor auxílio possível, sempre com boa vontade.

## Resumo

É crescente o número de trabalhos que vêm demonstrando através de ensaios *in vitro*, que as maçãs possuem elevado potencial antioxidante. Contudo, para que esse potencial se mantenha nas condições fisiológicas é necessário, entre outras condições, que os compostos por ele responsáveis resistam à digestão gastrointestinal. Este trabalho teve por objetivo avaliar a biodisponibilidade em antioxidantes e em compostos fenólicos de três variedades de maçã produzidas em Portugal, nomeadamente as variedades Jonagold, Golden Delicious e Royal Gala. Para isso compararam-se os resultados obtidos em amostras preparados em acetona e em amostras submetidas a uma simulação *in vitro* da digestão gástrica e gastrointestinal. Para todas as amostras foi avaliado o teor em fenóis e flavonóides totais, bem como, a atividade antioxidante através de diferentes ensaios (FRAP, CUPRAC, sequestro dos radicais hidroxilo, anião superóxido e DPPH).

Os resultados obtidos mostraram que a simulação *in vitro* das digestões, levaram, de um modo geral, à diminuição do teor em compostos fenólicos e em flavonóides bem como da atividade antioxidante detetada. Assim, de acordo com os resultados obtidos, após a digestão gastrointestinal cerca de 65% dos polifenóis, para todas as variedades, e cerca 45% dos flavonóides, para as variedades Jonagold e Golden e 60% para a variedade Royal Gala, presentes nas maçãs ficaram disponíveis para poderem ser posteriormente absorvidos. Foi igualmente possível verificar que a solubilização dos compostos fenólicos ocorre maioritariamente durante a fase gástrica da digestão, ocorrendo um pequeno aumento do teor destes compostos durante a fase intestinal. Contudo, este aumento do teor de compostos fenólicos, e, em particular de flavonóides, nem sempre se traduziu num aumento da atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** maçã; compostos fenólicos; atividade antioxidante, digestão *in vitro*.

## Abstract

It is growing number of studies that come demonstrate through *in vitro* assays that apples have high antioxidant potential. However for this potential remains in physiological conditions it is necessary, among other conditions, that the compounds responsible for it resist to the gastrointestinal digestion. This work aimed to evaluate the bioavailability of antioxidants and phenolic compounds of three varieties of apple produced in Portugal, namely Jonagold, Golden Delicious and Royal Gala varieties. To achieve this goal results obtained on samples prepared in acetone and on samples subjected to an *in vitro* simulation of the gastric and gastrointestinal digestion were compared. For all samples the phenols and flavonoids contents, as well as the antioxidant activity through different tests (namely FRAP, CUPRAC, DPPH and hydroxyl and superoxide anion radical scavenge) were evaluated.

The results obtained showed that the *in vitro* simulation of digestion led, in general, to a decrease in the flavonoids and phenolic contents as well as to a decrease in the antioxidant activity. Thus, according to the results obtained after gastrointestinal digestion about 65% of polyphenols for all varieties, and about 45% of flavonoids for Golden and Jonagold varieties and 60% for Royal Gala, are available for subsequent uptake. It was also verified that the release of polyphenols from apples is mainly achieved during the gastric phase, occurring a small increase in the content of these compounds in the intestinal phase. However, this increase polyphenols and flavonoids content not always resulted in an increase in antioxidant activity.

**Keywords:** Apple, phenolics compounds, antioxidant activity, *in vitro* digestion.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A Maçã.....	2
1.1.1. Produção e Consumo de Maçã .....	2
1.1.2. Variedades de Maçã.....	4
1.1.3 Composição Nutricional da Maçã.....	7
1.4. Efeitos benéficos para a saúde humana .....	9
1.5. Radicais Livres.....	11
1.6. Antioxidantes.....	13
1.7. Compostos Fenólicos como antioxidantes naturais .....	15
1.8. Polifenóis na Maçã.....	17
1.8.1. Ácidos fenólicos.....	17
1.8.2. Flavonóides .....	19
1.9. Aparelho Digestivo Humano .....	21
1.10. Biodisponibilidade dos Compostos Fenólicos.....	23
1.11. Ensaio in vitro.....	27
1.12. Enquadramento e Objetivos .....	28
2. Materiais e Métodos.....	29
2.1. Reagentes e enzimas.....	29
2.2. Aquisição das maçãs.....	29
2.3. Preparação das amostras.....	29
2.3.1. Preparação dos extratos em acetona .....	30
2.3.2. Simulação da digestão gástrica.....	30
2.3.3. Simulação da digestão gastrointestinal .....	30
2.4. Determinação dos fenóis totais - Método de Folin-Ciocalteu .....	31
2.4.1. Princípio do método.....	31
2.4.2. Procedimento experimental .....	31
2.5. Determinação dos flavonóides totais .....	32
2.6. Determinação da capacidade antioxidante .....	33
2.6.1. Capacidade de Sequestro do radical DPPH•.....	33
2.6.1.1. Princípio do método .....	33
2.6.1.2. Procedimento experimental.....	33

2.6.2. Avaliação da capacidade de redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC .....	34
2.6.2.1. Princípio do método .....	34
2.6.2.2. Procedimento experimental .....	34
2.6.3. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP .....	35
2.6.3.1. Princípio do método .....	35
2.6.3.2. Procedimento experimental .....	36
2.6.4. Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical hidroxilo através da diminuição da degradação da desoxirribose .....	36
2.6.4.1. Princípio do método .....	36
2.6.4.2. Procedimento experimental .....	37
2.6.5. Capacidade de sequestro do radical anião superóxido .....	38
2.6.5.1. Princípio do método .....	38
2.6.5.2. Procedimento experimental .....	39
2.7. Análise estatística dos resultados .....	40
3. Resultados e Discussão .....	41
3.1. Determinação do teor em fenóis totais .....	41
3.2. Determinação do teor em flavonóides totais .....	42
3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante .....	43
3.3.1. Avaliação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC .....	43
3.3.2. Avaliação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP .....	44
3.3.3. Capacidade de Sequestro do Radical DPPH• .....	46
3.3.4. Capacidade de Sequestro do Radical Hidroxilo .....	47
3.3.5. Capacidade de Sequestro do Radical Anião Superóxido .....	48
4. Conclusão .....	49
Referências Bibliográficas .....	51



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Produção Importação, Exportação e consumo aparente (ton), de maçã em Portugal (Globalagrinar, 2013). .....	4
Figura 1.2 - Variedades de maçã mais produzidas nos 27 países da União Europeia (UE), no ano de 2008 (Santos, 2011). .....	5
Figura 1.3 – Aspeto da maçã Royal Gala ( <a href="http://www.pt.all.biz/maca-bgg1056084">http://www.pt.all.biz/maca-bgg1056084</a> ). .....	5
Figura 1.4 – Aspeto da maçã Golden Delicious ( <a href="http://www.pt.all.biz/maca-bgg1056084">http://www.pt.all.biz/maca-bgg1056084</a> ). .....	6
Figura 1.5 – Aspeto da maçã Jonagold ( <a href="http://www.kimmelorchard.org/orchard/apples/jonagold/">http://www.kimmelorchard.org/orchard/apples/jonagold/</a> ). .....	6
Figura 1.6 - Estrutura química de antioxidantes naturais e sintéticos (Prado, 2009). .....	13
Figura 1.7 - Classificação dos antioxidantes. Adaptado de (Ratnam <i>et al.</i> , 2006 e Wanh <i>et al.</i> , 1996). .....	14
Figura 1.8 - Principais classes de compostos fenólicos (Ferreira & Abreu, 2007). .....	16
Figura 1.9 - Síntese de compostos fenólicos através de duas vias metabólicas (ácido chiquímico e ácido malónico) (Yamada e Castro, 2013). .....	16
Figura 1.10- Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: A – ácidos hidroxibenzóicos; B – ácidos hidroxicinâmicos (Soares, 2002). .....	18
Figura 1.11 - Estrutura química do ácido clorogénico (Martins, 2012). .....	18
Figura 1.12 - Estrutura base dos flavonóides composta por dois anéis benzénicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C) (Tomás-Barberán <i>et al.</i> , 2000). .....	19
Figura 1.13 – Classificação das principais famílias de flavonóides na natureza (Oldoni, 2010). .....	20
Figura 1.14 – Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrointestinal e alguns órgãos anexos (Giori, 2010). .....	21
Figura 1.15 - Esquema sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo (Stahl <i>et al.</i> , 2002). .....	26
Figura 2.1 - Reacção de desativação do radical DPPH• (Moon e Shibamoto, 2009). .....	33

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1- Composição média de seis variedades de maçã com casca em vitaminas e minerais (Adaptado de INSA, 2013).....</b>	<b>8</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------

## **Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos**

**Abs** – Absorvância

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico;

**ATP** – Trifosfato de adenosina;

**BHA** - Butil-hidroxianisol;

**BHT** - Butil-hidroxitolueno;

**CUPRAC** - Cupric Reducing Antioxidant Capacity

**DPPH<sup>•</sup>** – Radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo;

**eq** – Equivalente;

**EAA** – Equivalentes de ácido ascórbico;

**EAG** – Equivalentes de ácido gálico;

**EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**FRAP** - Ferric Reduction Antioxidant Power

**LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade;

**NADH** - Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida;

**NBT<sup>2+</sup>** - Azul de nitrotetrazólio;

**OMS** – Organização Mundial de Saúde;

**PMS** - Metossulfato de fenazina;

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigénio;

**rpm** - Rotações por minuto;

**SOD** - Superóxido dismutase;

**TBA** – Ácido tiobarbitúrico;

**TBHQ** - terc-butil-hidroquinona;

**TPTZ** - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina;

**UE** - União Europeia;

**USDA** - National Nutrient Database for Standard Reference;

**UV** – Ultravioleta;

**$\lambda$**  - Comprimento de onda;

## 1. INTRODUÇÃO

É sabido que os radicais livres causam danos oxidativos aos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo levar a um grande número de patologias. A incompleta eficácia de nosso sistema endógeno de defesa antioxidante, a influência de fatores externos como a exposição ao fumo, poluição, radiação ultravioleta (UV) ou alimentação, bem como a existência de alguns processos fisiopatológicos tais como, por exemplo, a obesidade ou os processos inflamatórios contribuem para o desenvolvimento de situações de “stress” oxidativo. Neste contexto, os compostos bioativos provenientes da dieta podem ajudar a suprir as deficiências antioxidantes promovendo proteção, prevenção ou a redução dos efeitos causados pelo “stress” oxidativo (Huong *et al.*, 20005; Pietta, 2000).

Aumenta-se a cada dia a procura de alimentos que possam trazer benefícios e bem-estar para a saúde. Os frutos e outros vegetais têm sido amplamente reconhecidos, em pesquisas epidemiológicas, por apresentarem um efeito protetor contra vários tipos de tumores e contra doenças cardiovasculares (Shahidi, Finley, 2001). Para dar mais suporte a esta hipótese existem estudos epidemiológicos que indicam a existência de uma correlação inversa entre o consumo de frutas e legumes ricos em polifenóis e o aparecimento de doenças cardiovasculares e enfartes de miocárdio diversos tipos de cancro, cataratas, diabetes, doença de Alzheimer e até a asma. Desta forma, os antioxidantes da nossa dieta, em particular, os polifenóis, poderão ter um papel importante na prevenção destas doenças (Boyer & Liu, 2004).

Uma vez que apresentam na sua composição uma série de compostos bioativos, denominados compostos fitoquímicos, as frutas são consideradas alimentos funcionais. As concentrações destes compostos variam de acordo com a cultivar, ponto de colheita, forma de armazenamento, processamento e parte da fruta analisada (Anzuategui, 2009). As frutas têm demonstrado possuir diversas propriedades específicas, que parecem dever-se a esses compostos fitoquímicos. Dentro dessas propriedades incluem-se, por exemplo, propriedades antioxidantes, antimutagénicas, antibacterianas, anti-inflamatórias, antivirais ou antiangiogénicas. Inúmeros desses fitoquímicos parecem aumentar a expressão das enzimas de detoxificação, aumentar as defesas imunitárias do organismo, diminuir a agregação plaquetária e promover um perfil lipídico saudável (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

Os erros alimentares são uma das mais importantes causas do aumento das doenças crónicas. As doenças cardiovasculares são mesmo a principal causa de morte em Portugal. O consumo adequado de frutas e hortícolas pode ajudar a prevenir este tipo de doenças, por isso é tão importante a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de consumir três a cinco peças de fruta por dia (Feliciano, 2013).

## 1.1. A Maçã

A maçã apresenta uma pele fina e impermeável, sabor agridoce ou ácido (dependendo da espécie) e polpa homogênea. É um fruto rico em água (aproximadamente 85% em massa) que sofre grandes transformações bioquímicas durante o seu amadurecimento (Santana, 2012). Numa alimentação saudável, a maçã, fornece fibras, destacando-se a pectina, vitaminas, destacando-se o ácido ascórbico, sais minerais, destacando-se o potássio, e substâncias antioxidantes com reconhecida importância como componentes de uma dieta humana equilibrada (Henríquez *et al.*, 2010). Pobre em gordura e equilibrada em frutose, este fruto, pode ser utilizado em dietas de emagrecimento, ser consumido entre refeições ou no final das mesmas (frescas ou em sobremesas), podendo ainda constituir um ingrediente nos mais variados pratos (Bértolo, 2011).

Diversos efeitos benéficos para a saúde que têm vindo a ser associados ao consumo de maçãs parecem resultar do conteúdo em polifenóis que estes frutos apresentam. Os polifenóis formam uma das principais classes de metabolitos secundários das plantas, com uma variada gama de estruturas e funções, que incluem sempre pelo menos um anel aromático com um ou mais constituintes hidroxilos (Robards *et al.*, 1999). Estes compostos fenólicos estão entre os fitoquímicos que podem prevenir o aparecimento de doenças, tendo seus efeitos via ação antioxidante, minimizando o “stress” oxidativo e suas consequências (Zardo, 2007). Dentro dos compostos fitoquímicos identificados na maçã encontram-se o ácido gálico, o propilgalato e, principalmente, o ácido salicílico (Wolfe *et al.*, 2003).

A macieira (*Malus domestica* Borkh) é originária da Europa e Ásia Ocidental onde o seu ancestral selvagem, *Malus sieversii*, ainda é encontrado atualmente. A macieira pertence à família *Rosaceae* e do género *Malus* e abrange cerca de 100 géneros e mais de 2 000 espécies espalhadas por todo mundo. Esta planta é uma espécie fruteira, lenhosa, decídua e adaptável a diferentes condições climáticas (Luchi, 2002; citado por Tessmer, 2009).

As macieiras são plantas com gineceu de dois a cinco carpelos (raras vezes monocarpelar, dando origem a um único fruto), crescentes e aderentes ao receptáculo carnudo. As condições ótimas para o seu crescimento ocorrem em países de clima temperado, com temperatura amena no Verão e pluviosidade não muito intensa no Inverno. No que se refere aos solos, esta planta, prefere solos argil -arenosos, profundos, soltos e bem drenados (Santos, 2011).

### 1.1.1. Produção e Consumo de Maçã

A produção mundial de maçã teve um aumento gradual desde a segunda guerra mundial. Este aumento de produção resultou, principalmente, da aplicação de métodos de

produção mais intensivos, juntamente com o aumento das áreas dos pomares (O'Rourke, 2003).

Atualmente, a China é o maior produtor de maçã no mundo, com um contributo de cerca de 43% na produção mundial. Em segundo lugar, mais bastante afastados, aparecem os Estados Unidos da América com 6%, seguidos do Irão e Turquia, cada um com um peso de 4%. Na União Europeia (UE-27), os produtores mais importantes de maçã são a Polónia, Itália e França, com um peso de cerca de 10%. A produção nacional corresponde a cerca de 2% da produção anual da UE-27 (Globalagrimar, 2013).

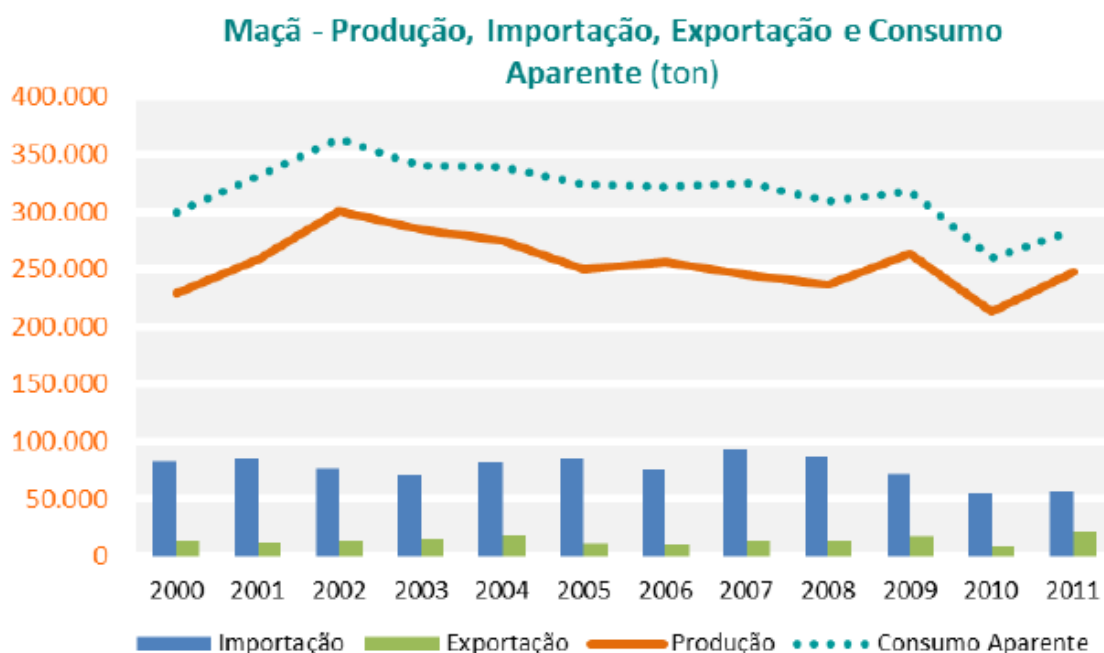
Em Portugal, a maçã representa um importante sector na produção agrícola, sendo a espécie com maior peso na produção de frutos frescos, no continente, sobretudo nas regiões de Lisboa (Ribatejo e Oeste), Porto e Norte (Trás-os-Montes) e Centro, correspondendo a sua produção a 26,5% do volume total (Bértolo, 2011).

Segundo o Globalagrimar (2013), a “maçã é um produto com um potencial de crescimento assinalável, tendo presente, não só as excelentes condições agronómicas e climáticas nacionais, mas igualmente o interesse manifestado pelos consumidores e agentes económicos.” Neste contexto antevêm-se, para o próximo período, as seguintes tendências:

- **Aumento da produção**, contrariando a tendência no sentido do decréscimo da produção registada ao longo da última década;
- **Aumento da quota no mercado nacional e o crescimento a nível do mercado externo**, reforçando as competências das organizações neste domínio, num quadro de uma orientação mais focada para novos mercados e novas oportunidades de negócio;
- **Melhoria da capacidade de conservação** do produto, facilitando a logística e melhorando a apresentação do produto no consumidor final;
- **Maior integração dos operadores na cadeia alimentar** e resiliência à volatilidade dos preços;
- **Reposicionamento da imagem do produto no mercado global** – notoriedade associada à qualidade, diferenciação e segurança alimentar;

O consumo de maçã em Portugal aumentou nas duas últimas décadas, tendo estabilizado nos últimos anos nas 317 000 toneladas por ano. Verifica-se uma valorização da maçã de qualidade e/ou de variedades tradicionais, sob uma imagem que valoriza a saúde (Santana, 2012). Como o aumento do consumo de maçã não tem sido acompanhado por um correspondente acréscimo da oferta proveniente da produção nacional, tem-se agravado o

défice das trocas com o exterior, contabilizando-se, para o ano de 2011, um valor de importações (entradas) em torno dos 40M€, face a um valor de exportações (saídas) de 11M€ (Globalagrimar, 2013) (Figura 1.1).

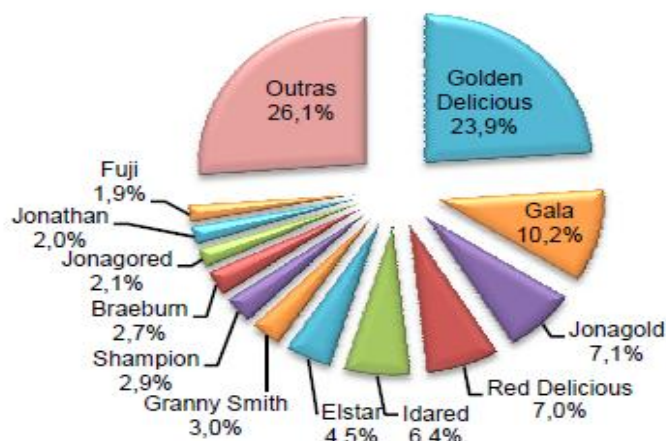


**Figura 1.1** – Produção Importação, Exportação e consumo aparente (ton), de maçã em Portugal (Globalagrimar, 2013).

### 1.1.2. Variedades de Maçã

Há centenas de variedades de macieiras cultivadas e desenvolvidas em todo o mundo, porém todas derivam da macieira silvestre. A cultura de macieiras terá tido início cinco séculos antes de Cristo, pelos Gregos e Romanos, que a espalharam pela Europa e Ásia. Na Idade Média, o cultivo desta planta, predominou nas zonas com forte influência das ordens religiosas. Quando os europeus se instalaram no Novo Mundo, muitas variedades de maçãs foram levadas para essas regiões, a partir das quais evoluíram novas variedades. Em Portugal, predomina a espécie *Malus communis* (Santos, 2011).

São hoje conhecidas mais de 10 000 variedades diferentes de maçãs, embora apenas uma muito pequena percentagem destas seja produzida e comercializada à escala global (Hampson & Kemp, 2003) (Figura 1.2). No cultivo de maçãs em Portugal destacam-se com maior expressão as variedades: *Golden Delicious*, *Gala (Royal Gala)*, *Red Delicious/Starking*, *Jonagold*, *Jonagored*, *Reineta (Parda e Branca)* e *Bravo de Esmolfe*. Com menor expressão surgem ainda as *Riscadinha de Palmela*, *Casa Nova*, *Granny Smith* e *Pink Lady* (Bertólo, 2011; Ferreira, 1994).



**Figura 2.2** - Variedades de maçã mais produzidas nos 27 países da União Europeia (UE), no ano de 2008 (Santos, 2011).

A variedade Gala teve origem na Nova Zelândia (J.H. Kidd – Greytown Wairarapa), em 1939, através de um cruzamento da ‘Cox’s Orange Pippin’ com a ‘Red Delicious’, seguido do cruzamento da variedade resultante (‘Kidd’s Orange Red’) com a ‘Golden Delicious’ (Santos, 2009). As maçãs ‘Royal Gala’ são uma das principais mutações desta cultivar e apresentam cor amarela com estrias laranja-avermelhadas em três a quatro quartos da sua superfície (Figura 1.3). A polpa dos frutos apresenta uma intensidade de coloração média, um sabor adocicado, um aroma agradável e uma consistência firme e sumarenta. Estas maçãs são normalmente consumidas em natureza (Sinha, 2006; Santos, 2009).



**Figura 3.3** – Aspeto da maçã Royal Gala (<http://www.pt.all.biz/maca-bgg1056084>).



A variedade *Golden Delicious* possui um porte semi-ereto, vigor médio e ramificação regular com lançamentos compridos, delgados e muito numerosos. A folhagem é sensível à necrose e queda. A produtividade é muito boa e regular, porém exige muita mão de obra para melhorar os calibres. É pouco sensível ao oídio, ao pedrado e ao “cancro” mas muito sensível a vírus e micoplasmas. Pela sua grande plasticidade cultural e produtividade, a *Golden Delicious* é a variedade mais cultivada em todo o mundo (Ferreira, 1994). As maçãs desta variedade possuem uma coloração verde-amarelada e têm uma polpa amarela, doce, sumarenta e de aroma intenso (Figura 1.4), sendo consumidas em natureza e muito utilizadas nas indústrias de sumo e produtos derivados de maçã (Sinha, 2006).



**Figura 4.4** – Aspeto da maçã Golden Delicious (<http://www.pt.all.biz/maca-bgg1056084>).

A variedade *Jonagold* resultou de um cruzamento entre as variedades *Jonathan* e *Golden Delicious*, os frutos têm um calibre médio a elevado, uma coloração entre o amarelo, o laranja e o vermelho. A polpa é fina, crocante, sumarenta, aromática e de coloração branca esverdeada (Figura 1.5). Estas maçãs podem ser consumidas em natureza ou utilizadas na preparação de bolos e tartes (Sinha, 2006).



**Figura 5.5** – Aspeto da maçã Jonagold (<http://www.kimmelorchard.org/orchard/apples/jonagold/>).

### 1.1.3 Composição Nutricional da Maçã

A composição química da maçã é intensamente influenciada pela variedade/cultivar, grau de maturação, técnicas culturais, data de colheita, condições de armazenamento, entre outros fatores (Santos, 2009).

A maçã é um fruto com cerca de 90% de parte edível, sendo a porção unitária recomendada de 160g (INSA, 2013). Estes frutos apresentam um excelente valor nutritivo, sendo bons fornecedores de fibras, tanto insolúveis (na epiderme) como solúveis, sendo, nomeadamente bons fornecedores de pectinas, que parecem ajudar a reduzir o nível sérico de colesterol. Estes frutos são muito pobres em gordura e equilibradas em frutose, têm uma grande riqueza em vitaminas (C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, niancina) e minerais como o potássio e fósforo, substâncias antioxidantes e fitonutrientes (Tognon, 2012; Feliciano, 2013). As maçãs contêm cerca de 57 kcal/100g (média de seis variedades) fornecidas maioritariamente por açúcares cujo perfil é variável em função da variedade de maçã (Martins, 2007; Feliciano *et al.*, 2010).

A elevada atividade de água ( $a_w$ ), cerca de 0,98, da maçã permite que se desenvolvam microrganismos que podem comprometer a segurança do produto (Santana, 2012). O conteúdo em água destes frutos é de cerca de 82,9g por 100g. Segundo Oliveira (2007), os principais fatores que influenciam a perda de água são a natureza e a estrutura do produto, o estado de maturação e respiração, fatores agroclimáticos (insolação, nutrição, etc.), defeitos ou feridas na epiderme (danos), arrefecimento demasiado lento ou tardio, temperatura de conservação demasiado elevada e irregular, humidade demasiado baixa e a circulação do ar à volta dos produtos.

Os açúcares são o componente mais abundante depois da água, representando cerca de 13,4% da composição da maçã. Cerca de 80% do total dos açúcares da maçã correspondem a açúcares simples, maioritariamente à frutose seguida da glucose e sacarose. As fibras, maioritariamente fibras solúveis, representam cerca de 2% da maçã e os ácidos orgânicos cerca de 0,2% (Sinha, 2006; INSA, 2013). O principal ácido orgânico da maçã é o ácido málico. O teor neste ácido começa a diminuir durante o processo de maturação e armazenamento, levando a mudanças de sabor que resultam do aumento da relação açúcar/ácido. Estas mudanças representam um atributo desejável para o sabor e aroma do fruto (Tessmer, 2009).

As proteínas encontram-se em quantidades relativamente baixas, representando cerca de 0,2% do peso da maçã. Estes compostos são sobretudo enzimas e desempenham um papel relevante no processamento dos frutos. Os lípidos constituem menos de 0,5% do peso da maçã e estão associados às camadas protetoras de cutícula na superfície do fruto e às membranas celulares (INSA, 2013; Santos, 2009).

A maçã contém ainda vitaminas e minerais (Tabela 1.1). Dentro das vitaminas hidrossolúveis existentes na maçã, destacam-se com maior importância a vitamina C (ácido

ascórbico) e a niacina (vitamina B<sub>3</sub> ou vitamina PP), dentro das lipossolúveis destaca-se o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Ao longo do período de maturação verifica-se um decréscimo nos teores de vitaminas C e A (Santos, 2009).

**Tabela 1.1- Composição média de seis variedades de maçã com casca em vitaminas e minerais (Adaptado de INSA, 2013)**

<b>VITAMINAS</b>	<b>Valor por 100g de parte edível</b>	<b>Valor por porção recomendada</b>
Vitamina A total (equivalente de retinol), $\mu$ g	4,0	6,4
Caroteno, $\mu$ g	26	42
Vitamina D, $\mu$ g	0	0
$\alpha$ -tocoferol, mg	0,59	0,94
Tiamina, mg	0,020	0,032
Riboflavina, mg	0,030	0,048
Equivalente de niacina, mg	0,20	0,32
Niacina, mg	0,10	0,16
Triptofano/60, mg	0,10	0,16
Vitamina B6, mg	0,040	0,064
Vitamina B12, $\mu$ g	0	0
Vitamina C, mg	7,0	11,2
Folatos, $\mu$ g	5,0	8
<b>MINERAIS</b>	<b>Valor por 100g de parte edível</b>	<b>Valor por porção recomendada</b>
Sódio, mg	6,0	9,6
Potássio, mg	139	222,4
Cálcio, mg	6,0	9,6
Fósforo, mg	8,0	12,8
Magnésio, mg	8,0	12,8
Ferro, mg	0,2	0,32
Zinco, mg	0	0

Os compostos responsáveis pelo aroma, presentes nos frutos, são compostos de baixa massa molecular (menor que 250), voláteis à temperatura ambiente que são sobretudo monoterpenos, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e ácidos. Estes compostos estão presentes em concentrações mínimas (menos de 10 mg por 100 g de produto), sob o ponto de vista nutricional não apresentam qualquer interesse direto, sendo no entanto fundamentais no aroma e sabor característicos do fruto (Wills *et al.*, 2007).

As maçãs contêm quantidades significativas de compostos fitoquímicos, sendo a epiderme particularmente rica em quercetina, a qual é reconhecidamente um composto com elevada atividade antioxidante (Anzuategui, 2009), catequinas e antocianinas e a polpa

particularmente rica em ácidos hidroxicinâmicos, em especial em ácido clorogénico (Sinha, 2006).

#### **1.4. Efeitos benéficos para a saúde humana**

São frequentemente atribuídos aos componentes presentes na fruta, como fibras, vitamina C e compostos fenólicos, os efeitos benéficos provenientes do consumo da maçã, principalmente na redução do colesterol. Os compostos fenólicos são de suma importância devido a contribuírem para a cor, sabor e aroma da fruta e dos seus produtos derivados. Estes compostos têm sido objeto de grande interesse por causa de suas propriedades biológicas, tais como atividade anti-inflamatória, antitumoral, antihistamínica, habilidade de captura de radicais livres e de proteção contra as doenças cardíacas. Os polifenóis da maçã, tais como a quercetina glicosídica, epicatequina, ácido clorogénico, procianidinas, demonstraram forte atividade antioxidante *in vitro* (Peng *et al.*, 2005), e estão em quantidade mais apreciáveis na casca e mucilagem da fruta, enquanto as sementes são constituídas por aproximadamente 81% de ácidos gordos tais como, por exemplo, os ácidos linoléico e palmítico (Peschel *et al.*, 2005).

Tem sido estudada a atividade antioxidante das maçãs em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Assim, em ensaios *in vitro*, extratos preparados a partir de diferentes variedades de maçã revelaram a capacidade de inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) humanas, verificando-se uma correlação positiva entre esta capacidade e o teor polifenóis totais das amostras analisadas. Por outro lado, foi possível verificar uma maior inibição da peroxidação de lípidos e maior capacidade antioxidante do plasma de ratos alimentados com a casca da maçã quando comparados com ratos alimentados apenas com a polpa, o que foi relacionado com a maior concentração de polifenóis existente na casca destes frutos (Leontowicz *et al.*, 2003; retirado de Martins, 2012). Em ensaios com ratos alimentados com maçãs verificou-se, igualmente que a presença deste fruto na alimentação levava uma redução do colesterol facto que também foi associado ao seu teor em polifenóis e em vitamina C. Em vários ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, os polifenóis da maçã têm revelado uma atividade antioxidante mais intensa do que a das vitaminas C e E (Lu & Foo, 2000).

Inúmeros ensaios epidemiológicos, *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que o consumo de maçãs pode ter efeitos benéficos para a saúde humana a vários níveis, destacando-se:

##### **a) Redução do colesterol e hipertensão**

A maçã tem uma quantidade significativa de potássio que favorece a excreção do sódio, reduzindo a retenção de líquidos e, por consequência, a pressão arterial. Além disso, o

facto de inibir a absorção de gorduras e de ajudar no controlo do colesterol tem um efeito indireto positivo no controlo da hipertensão arterial (McGuire, *et al.*, 2005).

A maçã oferece imensas virtudes medicinais, além do fato de ser a fruta que combina bem com praticamente todos os alimentos. É excelente para prevenir e manter a taxa de colesterol em níveis aceitáveis, através da ingestão de uma maçã por dia. Esse efeito é devido ao alto teor de pectina, encontrada na casca (Ribeiro, 2007).

O consumo diário de maçãs leva à redução de colesterol no sangue por duas vias principais. Por um lado, a maçã é rica em fibras que inibem a absorção intestinal e favorecem a excreção biliar do colesterol e, por outro, é rica em polifenóis que reduzem os níveis de LDL no plasma (Aprikian *et al.*, 2011). As fibras conferem proteção contra os altos níveis de colesterol, contribuindo assim para a diminuição dos riscos de aterosclerose, endurecimento das artérias e enfartes do miocárdio. De facto, alguns estudos realizados apontam para uma redução de 16% do nível de colesterol com apenas 2 maçãs na alimentação diária (Santos, 2011).

Outro benefício das fibras consiste na sua capacidade de captação de potenciais substâncias tóxicas (nomeadamente, metais pesados) dificultando a sua absorção intestinal (Santos, 2011).

## **b) Obesidade**

A maçã é pobre em gordura e equilibrada em frutose o que faz com que possa ser utilizada em dietas de emagrecimento (Bértolo, 2011). As suas fibras conferem uma sensação de saciedade, aspecto que favorece o controlo de peso. A pectina, também contribui para o emagrecimento, por dificultar a absorção das gorduras, da glucose e colesterol. O alto teor de potássio contido na polpa da maçã contribui para a eliminação do sódio excedente, o que contribui para eliminar o excesso de líquidos retidos no corpo (Ribeiro, 2007).

## **c) Diabetes tipo-2 e doenças cardiovasculares**

O consumo de maçãs tem sido associado à prevenção de doenças crónicas e redução do risco de doenças cardiovasculares (Teixeira, 2013). Estudos epidemiológicos associam o consumo da maçã a uma redução de risco de doenças cardiovasculares o que é justificado pelo seu elevado teor em polifenóis com uma elevada atividade antioxidante. Assim, estes compostos parecem ser capazes de inibir a oxidação das LDL e a consequente deposição nas artérias, evitando, assim, a aterosclerose. Como resultado, existe uma melhoria na circulação sanguínea reduzindo, consequentemente, o trabalho cardíaco e aumentando a vida útil do coração. A maçã inibe também a absorção da glucose e tem um efeito de controlo do apetite, graças ao seu teor em fibra, o que leva a que o consumo deste fruto esteja associado a uma

redução de risco de diabetes tipo 2. Também o facto de contribuir para o controlo da hipertensão e da obesidade, que são fatores de risco para o surgimento da diabetes tipo 2, leva a que a incidência desta doença em pessoas que consomem regularmente esta fruta seja inferior (Boyer & Liu, 2004).

#### **d) Cancro**

O consumo de maçãs tem sido associado à prevenção proteção do ácido desoxirribonucleico (ADN) e redução do risco de cancro. Há evidências comprovadas de que extratos de maçã inteira possuem atividade antioxidante e atividade antiproliferativa em células tumorais em cultura (Teixeira *et al.*, 2012).

A maçã é rica em polifenóis que, pela sua atividade antioxidante bem como por outras vias que serão mais à frente abordadas, pode reduzir a incidência do cancro, em particular do cancro do pulmão, como comprovam diversos estudos epidemiológicos. Em ensaios *in vitro*, extratos preparados a partir de maçãs ou alguns dos compostos fenólicos presentes nestes frutos, têm demonstrado uma potente actividade antiproliferativa em linhas celulares humanas de carcinoma do cólon (HT29), cancro gástrico humano (MKN45) e células leucémicas (HL-60). A esta atividade antiproliferativa soma-se uma atividade antioxidante que pode ajudar a prevenir as lesões oxidativas no ADN, bem como a oxidação de lípidos, da qual pode resultar a produção de compostos capazes de causar diversos danos celulares, possuindo alguns deles, como, é o caso do malonildialdeído, atividade cancerígena em ratos e mutagénica em células bacterianas e de mamíferos (Chung *et al.*, 1996; retirado de Martins, 2012).

### **1.5. Radicais Livres**

Uma espécie química que contém um ou mais eletrões desemparelhados é denominado de radical livre. Essas espécies atuam como aceitadores de eletrões de outras moléculas originando a sua oxidação. Os radicais livres, e moléculas com estes relacionados, são classificados como espécies reativas de oxigénio (ROS) devido à sua capacidade de causar danos oxidativos na célula (Migliore & Coppedè, 2009). AS ROS compreendem todas as formas reativas do oxigénio, incluindo radicais e não radicais que participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares (Pazini, 2012). Exemplos destas espécies são o radical anião superóxido, o radical hidroxilo, o radical peroxilo ou o peróxido de hidrogénio

Os estudos pioneiros a respeito de radicais livres ocorreram por volta de 1924, contudo, apenas nos anos setenta, foi relatada a importância desses radicais para os seres vivos. Nos organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos continuamente durante os

processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrões em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo (Bast *et al.*, 1991, retirado de Caetano, 2009).

No organismo são produzidos radicais livres de carbono, enxofre, azoto e oxigénio, porém entre todos os que mais se destacam, devido à reatividade e aos danos que podem ocasionar, são os radicais derivados do oxigénio (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008). O oxigénio apresenta um papel fundamental na complexa e perfeita evolução da vida na Terra, principalmente devido à harmonia bioquímica entre a fotossíntese e a respiração aeróbia que mantém a homeostase na biosfera do planeta (Buonocore *et al.*, 2010). Todos os organismos aeróbios utilizam o oxigénio molecular para gerar trifosfato de adenosina (ATP), ou seja, para gerar a energia necessária para a manutenção da vida. Entretanto, o oxigénio pode tornar-se tóxico e mutagénico devido ao seu forte poder oxidante e à impossibilidade de evitar a ocorrência de reações secundárias que dão origem a espécies reativas de oxigénio (Sorg, 2004; Buonocore *et al.*, 2010).

Os organismos vivos encontram-se comumente numa situação de equilíbrio entre o seu potencial pró-oxidante e antioxidante. Uma alteração desse equilíbrio em favor do potencial oxidante designa-se por “stress” oxidativo. O “stress” oxidativo pode resultar de uma depleção de antioxidantes, devida a uma nutrição deficiente ou a uma produção em excesso de espécies reativas de oxigénio, tanto de origem endógena como exógena. A exposição a condições de “stress” oxidativo suaves conduz, geralmente, a um aumento da síntese dos sistemas de defesa antioxidante, com o objetivo final de repor o equilíbrio. Por outro lado, a exposição a condições de “stress” oxidativo mais severas conduz a uma acumulação de lesões oxidativas, com implicações fisiopatológicas (Rasteiro, 2012).

As ROS podem levar a ocorrência de lesões oxidativas em diversos componentes celulares, tais como, os lípidos de membrana, proteínas, açúcares e ADN. Os danos causados nesses componentes celulares podem acumular-se, com o passar dos crónico-degenerativas, especialmente associadas com o avanço da idade, destacando-se o cancro, aterosclerose, doenças inflamatórias, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e cataratas (Harborne e Willians, 2000, citado por Gonçalves, 2008).

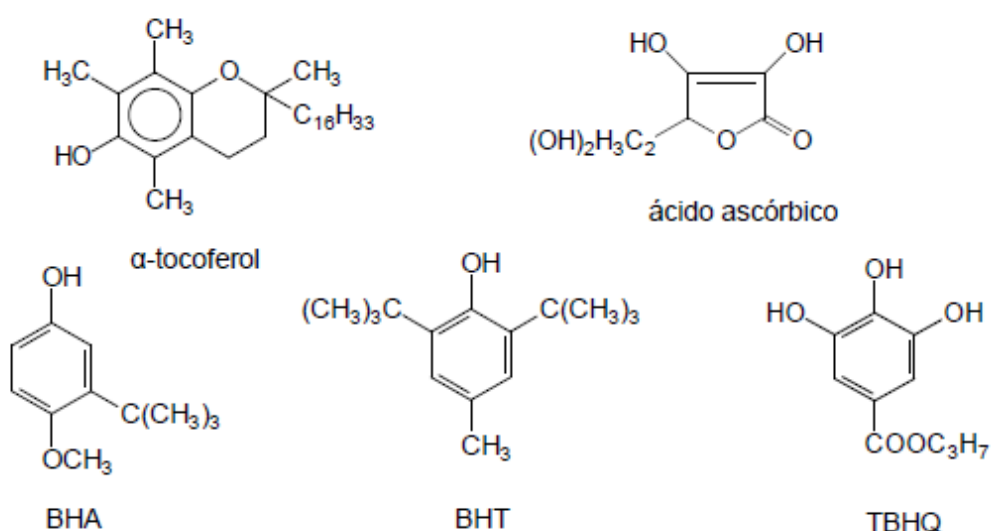
Os Radicais Livres são altamente instáveis, com tempos de semi-vida curtos, e quimicamente muito reativos, podendo causar danos por reagir com praticamente qualquer molécula com que entram em contato (Halliwell e Gutteridge, 1998; retirado de Gonçalves, 2008). A maioria destes radicais surge durante o metabolismo normal. Por exemplo, as células do sistema imunitário do organismo produzem estes radicais com o objetivo de neutralizar vírus e bactérias. Porém, fatores ambientais como a exposição à radiação ionizante, uma nutrição desequilibrada, a exposição a metais como, por exemplo, cádmio, crómio e níquel, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dióxido de enxofre, pesticidas como o paraquato e substâncias do fumo do tabaco, podem gerar um aumento da formação destes radicais. Assim,

as ROS podem, por um lado, produzir efeitos benéficos, podendo, por outro lado, produzir efeitos deletérios quando geradas em excesso (Zardo, 2007; Anzuategui, 2009; Rasteiro, 2012).

Várias enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular, presentes no organismo humano, atuam como um sistema de defesa efetivo para eliminar os radicais livres. Os compostos fenólicos podem aliviar o “stress” oxidativo e suas consequências, devido às suas características de compostos antioxidantes (Zardo, 2007).

## 1.6. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias aptas para retardar ou inibir a oxidação das moléculas biológicas, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação. Estes compostos, geralmente apresentam uma estrutura química aromática e contêm pelo menos um grupo hidroxilo, podendo ser sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) ou o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), largamente utilizados pela indústria alimentar, ou naturais, como é o caso dos compostos organosulfurados e fenólicos dos terpenos ou das vitaminas C e E que fazem parte da constituição de diversos alimentos (Fennema, 1993; Brenna e Pagliarini, 2001; Zheng e Wang, 2001, retirado de Nascimento, 2010) (Figura 1.6).

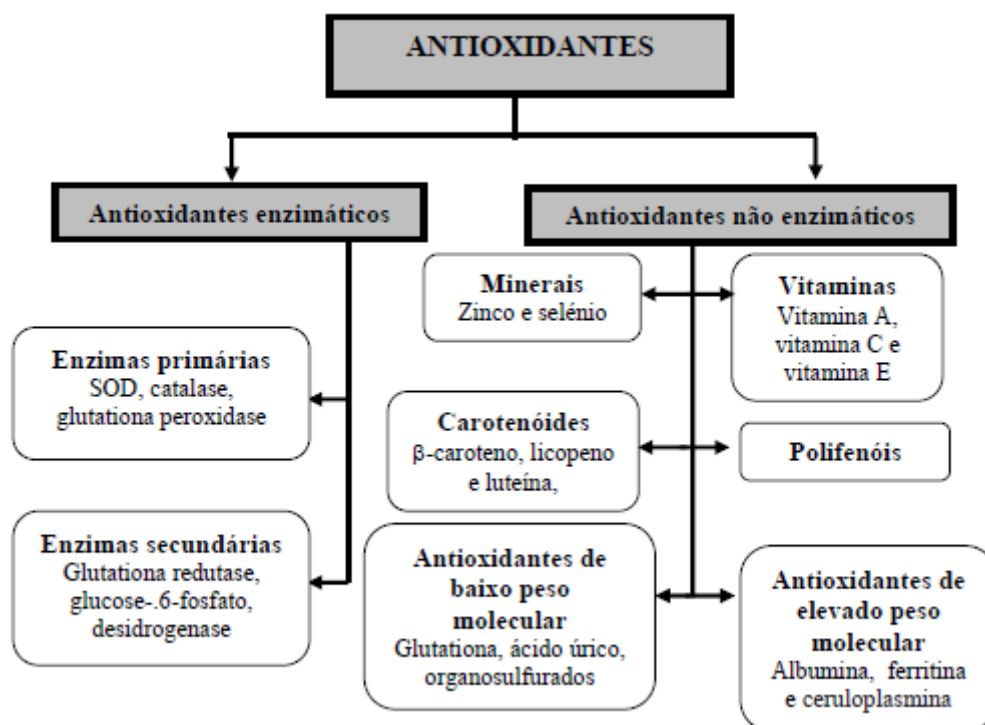


**Figura 6.6** - Estrutura química de antioxidantes naturais e sintéticos (Prado, 2009).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias, os enzimáticos, que são capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, são enzimas que removem as espécies reativas de oxigénio, e os não enzimáticos, que são moléculas que interagem com as ROS, ou



com os compostos que intervêm na sua formação, sendo consumidas durante a reação. Exemplos dos antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Exemplos destes antioxidantes não enzimáticos são macromoléculas como a albumina, ceruloplasmina e ferritina e moléculas mais pequenas como o ácido úrico, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e outros carotenóides, glutathione reduzida, arginina, citrulina, taurina e creatina e ainda elementos minerais como o zinco e o selénio (Gonçalves, 2008; Jardim, 2010; Ratnam *et al.*, 2006 e Wanh *et al.*, 1996) (Figura 1.7).



**Figura 7.7** - Classificação dos antioxidantes. Adaptado de (Ratnam *et al.*, 2006 e Wanh *et al.*, 1996).

Os compostos antioxidantes podem estabilizar as espécies reativas por doação de eletrões ou de átomos de hidrogénio, por quelação de metais de transição envolvidos no processo oxidativo ou por inibição das enzimas oxidativas. O acesso destes compostos aos diferentes compartimentos celulares, e, portanto, o seu local de ação, depende do seu carácter hidrofílico ou lipofílico e do seu coeficiente de participação (Shahidi *et al.*, 1992; Manach e Donovan, 2004; retirado de Jardim, 2010).

A eficácia antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal vai depender da sua estrutura e da sua concentração no alimento. Por sua vez, a quantidade destas substâncias em vegetais é largamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade das plantas (Nascimento, 2010).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas

desses compostos podem ser atribuídos à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (Decker, 1997, citado por Prado, 2009). Para além da capacidade antioxidante, os compostos fenólicos, apresentam outras atividades biológicas importantes, tais como atividades anti-inflamatórias, antialérgicas, antimicrobiana e anticancerígenas, sendo que algumas destas são também o resultado da sua ação antioxidante (Arçari, 2009).

O papel dos antioxidantes na prevenção de doenças está sendo investigado e se multiplicam em escala exponencial os estudos publicados que sugerem que o binómio “alimentação-antioxidantes” desempenhe papel fundamental no crescimento ou redução de problemas cardiovasculares (incluindo a precursora hipertensão arterial), vários tipos de cancro, lesões no ADN, envelhecimento, patologias como a doença de Alzheimer, a diabetes, a artrite reumatóide, a síndrome metabólica e processos neurodegenerativos, alterações imunológicas e processos inflamatórios como a adesão plaquetária (Pimentel *et al.*, 2005; citado por Barros, 2011).

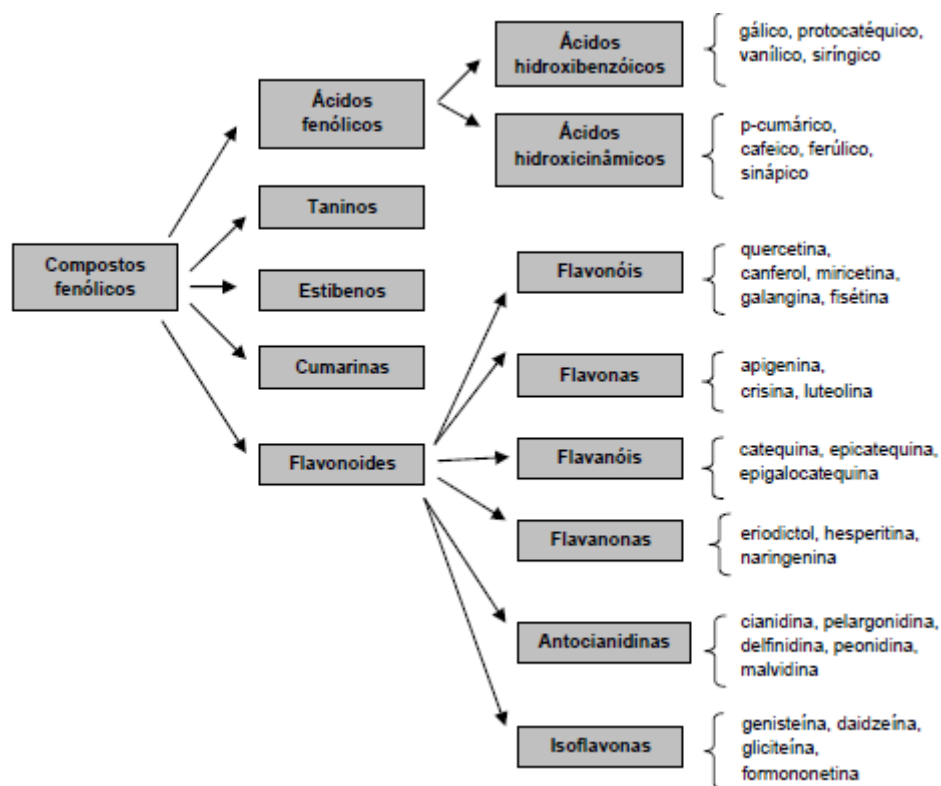
A medida de capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes num extrato ou amostra biológica proporcionando, desta forma uma análise de integrada deste parâmetro. A maior ou menor capacidade antioxidante determinada em ensaios de laboratório depende do substrato utilizado, do solvente e da técnica de extração utilizada (Nascimento, 2010). A capacidade antioxidante pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detectar mudanças no “stress” oxidativo *in vivo*, fornecendo ajuda na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes, e ainda, fornecer informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes (Ghiselli *et al.*, 2000).

### **1.7. Compostos Fenólicos como antioxidantes naturais**

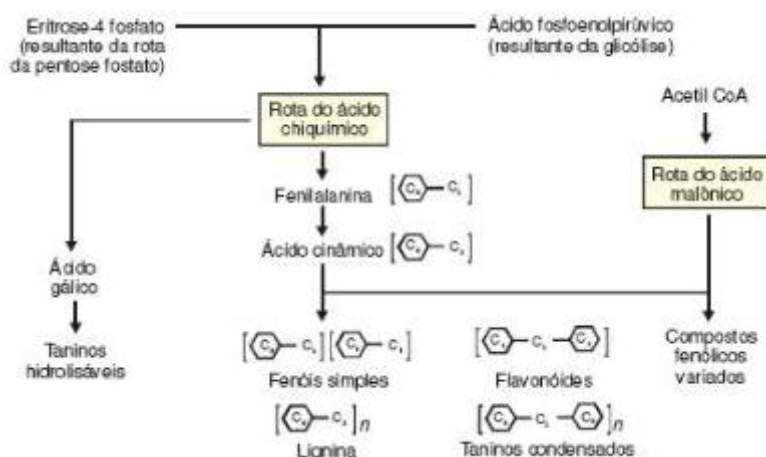
Os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo como grupos funcionais. Estes são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, luz, calor ou em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados. Alguns compostos são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros, como é o caso das formas glicosiladas são solúveis em água, e existem ainda os grandes polímeros, que são totalmente insolúveis (Prado, 2009; Tiveron, 2010). A classe de compostos fenólicos engloba mais de 8 000 compostos, desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, podendo dividir-se em diferentes classes (Figura 1.8) (Ferreira & Abreu, 2007). Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas e ocorrem naturalmente em frutas frescas, vegetais, nos chás e nos vinhos tintos fazendo parte integral da dieta humana (Arçari, 2009).

A biossíntese dos polifenóis nos vegetais, pode ocorrer por meio de diferentes vias, razão pela qual eles constituem um grupo bastante heterogéneo. Duas vias metabólicas

básicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malónico (Bergamaschi, 2010) (Figura 1.9).



**Figura 8.8** - Principais classes de compostos fenólicos (Ferreira & Abreu, 2007).



**Figura 9.9** - Síntese de compostos fenólicos através de duas vias metabólicas (ácido chiquímico e ácido malónico) (Yamada e Castro, 2013).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a sua estrutura química estando os seus possíveis benefícios para a saúde igualmente relacionados com a sua absorção e metabolismo (Bergamaschi, 2010). O tipo de composto, o grau de metoxilação e o número de grupos hidroxilo são alguns dos parâmetros que determinam a atividade antioxidante. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (Gómez-Ruiz; Leake; Ames, 2007).

## 1.8. Polifenóis na Maçã

O conteúdo total de polifenóis, para a maioria das variedades de maçãs, encontra-se entre os 1 000 e 6 000 mg.kg<sup>-1</sup> de peso fresco, podendo alcançar até 10 000 mg.kg<sup>-1</sup> (Zardo, 2007; Balbi, 2009). Todavia, a atividade biológica destes compostos está diretamente ligada à sua estrutura química, que por sua vez é determinada por fatores ambientais, genéticos e de pós colheita onde se incluem o clima, a fertilização, as características de cada cultivar, o grau de maturação, as condições de solo, o manejo, a exposição à luz, as formas de armazenamento (Ribeiro, 2007; Bergamaschi, 2010; Martins, 2012).

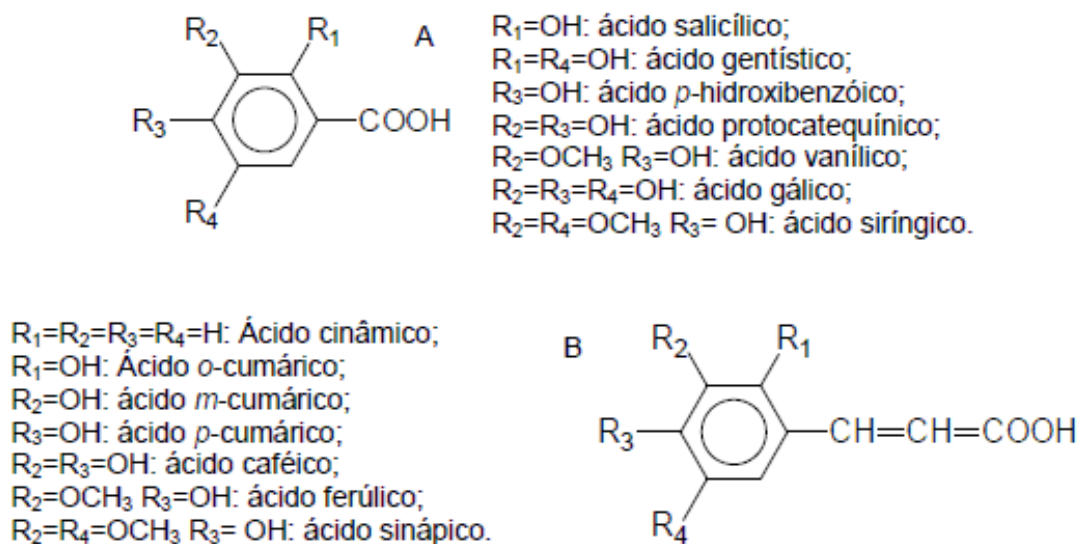
Nas maçãs encontram-se flavonóis, entre os quais a quercetina e o caempferol, flavanóis, entre os quais a (+)-catequina e a (-)-epicatequina, ácidos hidroxicinâmicos e derivados, entre os quais o ácido clorogénico, dihidrocalconas, entre as quais a floretina (polifenol característico da maçã), e antocianidinas, entre as quais a cianidina (Tomás-Barberán *et al.*, 2000; Feliciano *et al.*, 2010).

### 1.8.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzénico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos de hidroxilo na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção de diversas doenças (Arçari, 2009).

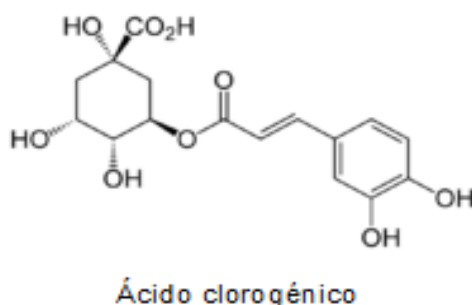
Na maioria dos casos, os ácidos fenólicos não são encontrados no seu estado livre, exceto em níveis traço, e sim em formas combinadas, solúveis e ainda acumulado em vacúolos ou insolúveis quando ligadas a componentes da parede celular (Macheix Fleuriet, Billot, 1990; citado por Anzuategui, 2009). Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos (Figura 1.10). O primeiro é composto pelos ácidos hidroxibenzóicos (ácido salicílico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido gálico, entre outros), que possuem estrutura com sete

átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo grupo é formado pelos ácidos hidroxicinâmicos (ácido cinâmico, ácido *o*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido sinápico, entre outros), que possuem nove átomos de carbono (C6-C3). Os ácidos hidroxicinâmicos podem ser encontrados em todas as partes da fruta embora a maior concentração esteja na parte externa de frutas maduras (Soares, 2002).



**Figura 10.10-** Estruturas químicas dos ácidos fenólicos: A – ácidos hidroxibenzóicos; B – ácidos hidroxicinâmicos (Soares, 2002).

Importantes no perfil fenólico da maçã, são os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos, que têm como principal representante o ácido clorogénico (Figura 1.11). Os ácidos fenólicos são importantes substratos para a enzima polifenoloxidase, contribuindo na formação de pigmentos castanhos (Zardo, 2007).

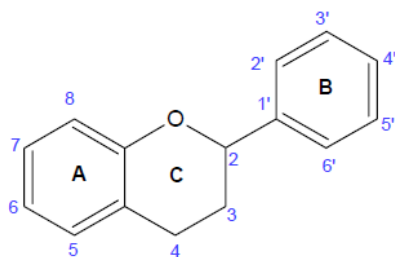


**Figura 11.11 -** Estrutura química do ácido clorogénico (Martins, 2012).

### 1.8.2. Flavonóides

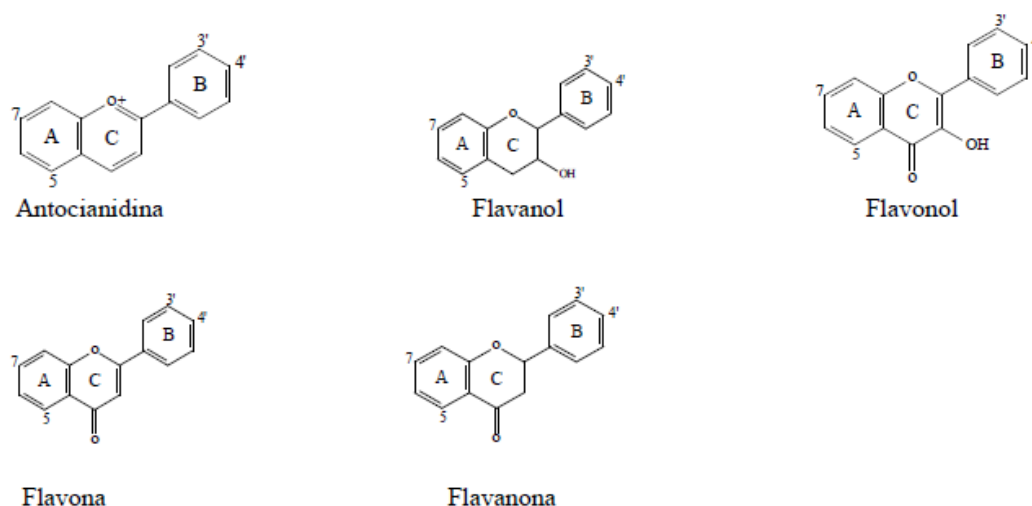
A palavra flavonóide tem origem no latim flavus, que significa amarelo, e incluía no início somente grupos de compostos que apresentavam a cor amarela e um núcleo flavona. Hoje, este termo é usado num amplo contexto e inclui compostos menos coloridos e incolores, bem como as antocianinas que apresentam coloração vermelha ou azul. Esses compostos compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, mas são constituintes de frutas, vegetais e nozes (Peterson; Dwyer, 1998; Rice-Evans, 2004; retirado de Oldoni, 2010).

Os flavonóides são substâncias aromáticas que contém 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, possuindo estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, onde os dois anéis C<sub>6</sub> são necessariamente aromáticos (anéis A e B), ligados por uma ponte de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (Rice-Evans, 2004, Manach *et al.*, 2004) (Figura 1.12).



**Figura 12.12** - Estrutura base dos flavonóides composta por dois anéis benzênicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C) (Tomás-Barberán *et al.*, 2000).

De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis); antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas. Estes compostos podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados. Como principais famílias de flavonóides na natureza podem citar-se as antocianidinas, os flavanóis, os flavonóis, as flavonas e as flavanonas (Oldoni, 2010) (Figura 1.13).



**Figura 13.13** – Classificação das principais famílias de flavonóides na natureza (Oldoni, 2010).

Os flavonóides são formados da combinação de derivados sintetizados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. (Arçari, 2009). A quantidade destes compostos, assim como a sua distribuição na maçã depende de fatores como a disponibilidade de nutrientes, a radiação solar, a temperatura, o estado de maturação da fruta e o seu contexto genético. Muitas das enzimas responsáveis pela síntese de flavonóides são induzidas pela exposição à luz o que faz com que a síntese destes compostos seja acelerada pela exposição solar (Arçari, 2009; Balbi, 2009).

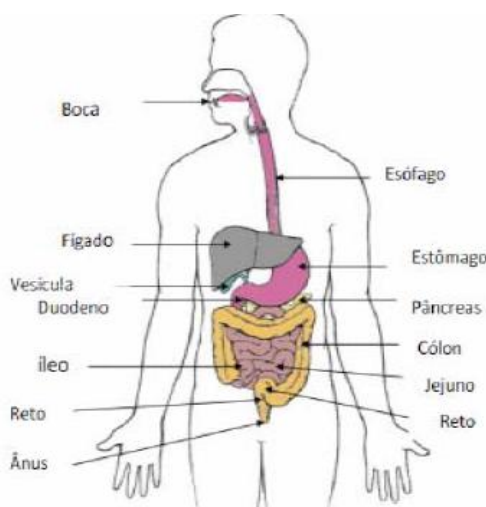
Os flavonóides são ácidos fracos, polares ou moderadamente polares, sendo por isso solúveis em etanol, metanol, butanol e combinações de solventes com água. Absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta e do visível, e dessa maneira apresentam um papel de defesa das plantas à exposição à radiação UV. Apresentam, normalmente, duas bandas de absorção no UV, sendo uma compreendida entre 220-295 nm e outra entre 300-390 nm (Robards *et al.*, 1999; citado por Tiveron, 2010). Além disso, os flavonóides podem representar uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros (Cooper-Driver, 2001, citado por Oldoni, 2010). Os flavonóides também podem agir como protetores de células vegetais por sequestrarem as ROS induzidas pela exposição à radiação UV necessária à fotossíntese (Pietta, 2000).

Uma diversidade de estudos *in vitro* tem mostrado que os flavonóides podem inibir e, às vezes, induzir uma grande variedade de enzimas envolvidas em importantes processos reguladores como a divisão e proliferação celular, agregação plaquetária, destoxificação, e resposta inflamatória e imune do organismo humano (Seinfried *et al.*, 2007; Willians *et al.*, 2004; citado por Gonçalves, 2008). Além das suas ações anti-inflamatórias e antioxidantes, os flavonóides são descritos pelos seus efeitos contra doenças crônicas como o cancro, doenças cardiovasculares e coronárias ou diabetes. As ações biológicas dos flavonóides sobre o

organismo animal acontecem, principalmente, pela semelhança entre a estrutura química destes compostos e muitas moléculas inerentes à bioquímica normal de células animais, entre elas coenzimas, hormonas esteróides e neurotransmissores. Esta semelhança explica, em parte, os seus efeitos inibitórios sobre enzimas, a ligação a recetores ou a indução da expressão de determinados genes. Além disso, a alta mobilidade dos eletrões no núcleo benzóico dos flavonóides contribui para sua ação antioxidante e neutralizadora de radicais livres (Havsteen, 2002; retirado de Meoti, 2007).

## 1.9. Aparelho Digestivo Humano

O tubo digestivo humano é constituído pela boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon – ascendente, transversal, descendente e sigmóide – e reto) e ânus, estando-lhe associados outros órgãos e glândulas secretoras anexos que também participam na digestão. Este tubo pode ser dividido em cinco regiões principais onde o alimento vai progredindo, permitindo que a digestão se dê em fases sequenciais (Lidon e Silvestre, 2009; Giori, 2010) (Figura 1.14).



**Figura 14.14** – Sistema digestivo humano, incluindo o trato gastrointestinal e alguns órgãos anexos (Giori, 2010).

As funções do aparelho digestivo incluem o processamento eficiente dos nutrientes e fluido, a absorção dos nutrientes necessários ao corpo e a eliminação dos resíduos não absorvidos. Para além destas funções, o aparelho digestivo tem ainda funções imunológicas e endócrinas, além de atuar como membrana semipermeável entre os meios externos e interno (Gaboardi, 2013).



Segundo Lidon e Silvestre (2009), “no decurso da mastigação e salivação, os alimentos são fragmentados em partículas mais facilmente digeríveis ao serem cortados pelos dentes, enquanto a saliva oriunda das glândulas salivares envolve as partículas dando início à digestão. A saliva também contém anticorpos e enzimas (nomeadamente lisozima), que quebram as proteínas e atacam as bactérias.”

No estômago o alimento sofre a ação do suco gástrico que é secretado pelas glândulas localizadas na parede estomacal. O muco é produzido pelas glândulas pilóricas e cárdicas do estômago e lubrifica o bolo alimentar, além de proteger a parede do estômago contra a ação das enzimas gástricas e do pH ácido. O ácido clorídrico presente no suco gástrico facilita a absorção de ferro, proporciona um pH ótimo para a digestão proteica, ativa o pepsinogênio a pepsina e tem ação germicida. As enzimas do suco gástrico são a pepsina e as lipases e amilases gástrica (Thiemann, 2013).

Os sais biliares (principalmente glicolato e taurocolato de sódio) são essenciais na digestão pois reduzem a tensão superficial dos glóbulos de gordura (resistentes à digestão enzimática), permitindo aos movimentos intestinais uma emulsificação dos mesmos, o que faz com que as lipases do suco pancreático sejam capazes de alcançar e hidrolisar os triglicéridos em ácidos gordos e monoglicéridos. Após este processo, esses produtos vão-se complexar com os sais de biliar e formar micelas. Os pigmentos biliares (produtos da quebra de hemoglobina proveniente de glóbulos vermelhos envelhecidos, que é feita no fígado) dão uma cor amarela esverdeada à secreção e dão às fezes a sua cor característica (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010, citado por Antunes, 2012).

O alimento ingerido passa pelo lúmen do trato gastrointestinal circula durante todo o processo da digestão e absorção dentro do tubo, e a porção não absorvível é eliminada como fezes. O sistema nervoso, juntamente com algumas hormonas, regulam o funcionamento do aparelho digestivo e o sistema circulatório nutre os órgãos da digestão e permite o transporte dos nutrientes absorvidos. A digestão é a transformação dos alimentos numa forma que possa ser utilizada pelo organismo em que as grandes moléculas de alimentos se tornam pequenas moléculas de nutrientes que serão absorvidas e utilizadas. As enzimas digestivas, são de suma importância no processo digestivo, e são classificadas como enzimas hidrolíticas (hidrolases), pois dividem as macromoléculas constituintes dos alimentos ingeridos por um processo de hidrólise (quebra da ligação química por adição de uma molécula de água) (Hickman *et al.*, 2006; Giori, 2010; citado por Antunes, 2012).

As células superficiais constituintes da parede interna do intestino delgado (mucosa) secretam o suco entérico, uma solução de pH neutro, rica em enzimas que continuam a digestão, como aminopeptidases, dissacaridasas (como a maltase, sacarase e a lactase), fosfatases alcalinas, nucleotidasas e nucleosidasas (Hickman *et al.*, 2006). O suco pancreático, produto do órgão anexo ao aparelho digestivo, o pâncreas, cujo pH oscila entre 7,8 e 9, contém tripsinogênio e quimiotripsinogênio (precursores inativos) que, após secretados para o lúmen

intestinal, sofrem ação enzimática, originando tripsina e quimiotripsina, respectivamente, (Soares *et al.*; 1999; citado por Antunes, 2012), proteases altamente específicas que continuam a degradação enzimática iniciada pela pepsina (inativada pela alcalinidade intestinal). O suco pancreático possui igualmente outras enzimas, como a carboxipeptidase, nucleases, lipase e amilase pancreática (Thiemann, 2013). O revestimento mucoso do intestino tem múltiplas pregas (vilosidades) e, com isso, aumenta a superfície de contacto para que ocorra a absorção intestinal dos nutrientes (Gaboardi, 2013).

No intestino grosso, que não possui vilosidades nem secreta sucos digestivos, ocorre a absorção de água, quer a ingerida, quer a proveniente das secreções digestivas, e de sais, e, por ação de numerosas bactérias que estabelecem uma relação mutual (envolvendo nomeadamente a síntese de vitamina K, B<sub>12</sub>, riboflavina e tiamina), processa-se a dissolução de restos alimentícios não assimiláveis (que demoram, em média, nove horas a atingir esta fase (Lidon e Silvestre, 2009). O intestino grosso possui considerável mobilidade, especialmente no cólon transversal e no sigmóide. As suas principais funções são a formação, transporte e evacuação das fezes. Toda a absorção ocorre na metade próxima do cólon (cólon de absorção), enquanto o cólon distal funciona principalmente no armazenamento (cólon de armazenamento). As fezes compõem-se de cerca de três quartos de água e um quarto de matéria sólida, sendo esta formada por cerca de 30% de bactérias mortas e vivas; e os 70% restantes são constituídos por sais, muco, fibras, celulose e outras substâncias não absorvidas e ainda substâncias não ingeridas tais como constituintes secos de sucos digestivos, como, por exemplo, os pigmentos biliares, e células epiteliais descamadas (Lidon e Silvestre, 2009; Gaboardi, 2013).

## **1.10. Biodisponibilidade dos Compostos Fenólicos**

O termo biodisponibilidade pode apresentar várias definições dependendo da área em que se aplica. Assim, do ponto de vista nutricional, a biodisponibilidade refere-se à fração de um nutriente presente em um dado alimento que fica de facto disponível para ser usado nas funções fisiológicas ou para ser armazenado. Isto é, somente certas quantidades de todos os nutrientes de um alimento serão usadas efetivamente pelo organismo (Tognon, 2012). Os compostos biodisponíveis serão aqueles que entram na corrente sanguínea, após separação da sua matriz no trato gastrointestinal, e atingem o seu local de ação biológica, tendo em conta toda a sequência de eventos que ocorre durante a transformação digestiva dos alimentos, incluindo a sua disponibilidade para absorção intestinal e a sua degradação metabólica (Ratnam *et al.*, 2006; Giori, 2010).

É aceite que a biodisponibilidade dos compostos fenólicos é bastante baixa, ainda mais quando se trata de compostos com grande peso molecular, estando mencionado que o conteúdo alimentar em compostos fenólicos complexos é bastante mais elevado do que o mesmo conteúdo em compostos fenólicos simples (Landete, 2012). Para além do peso

molecular, características como a solubilidade, o trânsito gastrointestinal, a permeabilidade da membrana e o pH do lúmen são igualmente fatores que podem influenciar a biodisponibilidade dos polifenóis (Lima, 2008; Lima, 2011). Desta forma, os polifenóis mais abundantes não são necessariamente os que apresentam melhor perfil de biodisponibilidade, não sendo por isso os que atingem maiores concentrações no interior das células humanas, ou porque não são resistentes à digestão gastrointestinal, ou porque são pouco absorvidos no intestino, altamente metabolizados ou rapidamente eliminados (Lima, 2008; Antunes, 2012). Acredita-se ainda, que exista uma variabilidade individual na forma como se processa a absorção, metabolismo e distribuição dos polifenóis em humanos (Matsumoto, 2008; Arçari, 2009).

O primeiro passo após a ingestão de compostos fenólicos presentes na dieta é a liberação dos mesmos da sua matriz. Esta libertação não ocorre no momento da ingestão uma vez que a saliva não tem o poder de realizar essa ação sobre os compostos fenólicos. A desglicosilação de flavonóides, a clivagem de proantocianidinas poliméricas e a hidrólise de ácidos fenólicos esterificados são considerados pré-requisitos para a absorção dos mesmos através da barreira intestinal. Alguns destes compostos, como as proantocianidinas poliméricas podem ser quebrados em moléculas menores (monómeros e dímeros de epicatequina) por ação do suco gástrico (Jardini, 2010; Gonçalves, 2012).

A absorção dos polifenóis pode ser medida de forma direta, através da pesquisa destes compostos ou dos seus metabolitos no plasma e urina, ou de forma indireta, pelo aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos nestes compostos (Lima, 2008; Jardim, 2010). Estudos de biodisponibilidade em humanos relatam que a quantidade de polifenóis intactos encontrados na urina pode variar de um composto para outro (Gonçalves, 2012). Dos vários polifenóis, o ácido gálico e as isoflavonas parecem ser os mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina. Os polifenóis de mais difícil absorção parecem ser as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas (Manach *et al.*, 2005; Pantelidis *et al.*, 2007; Galvano, 2008; retirado de Rasteiro, 2012).

A absorção intestinal dos flavonóides varia com o alimento onde estes se encontram e com a diversidade de resíduos de açúcares e de outros grupos funcionais ligados à sua estrutura base. De uma forma geral, os flavonóides são absorvidos na forma de agliconas (forma que se apresenta livre) após terem sofrido hidrólise no trato digestivo. Nesta forma, estes compostos são potencialmente mais bioativos que os compostos que lhes deram origem (Lima, 2008; Antunes, 2012). Contudo, há também informações que apontam no sentido de alguns flavonóides poderem ser absorvidos na forma glicosilada. Dependendo do açúcar a que se encontram ligados, os flavonóides glicosilados podem ou não ser mais facilmente absorvidos do que as respetivas agliconas (Lima, 2008). A absorção destes compostos pode também ser aumentada com a co-ingestão de alimentos ricos em gordura. Estima-se que apenas 5% dos flavonóides ingeridos atinjam a circulação sanguínea, ligam-se aí às proteínas e às membranas celulares das células sanguíneas (Ruel e Couillard, 2007).

O conhecimento da biodisponibilidade dos polifenóis constitui um fator chave para poder sugerir que os antioxidantes presentes nos alimentos possam de fato conferir uma maior proteção contra o “stress” oxidativo de quem os consome. De fato, para que estes compostos possam apresentar efeitos *in vivo* têm que chegar aos tecidos, na sua forma nativa ou na forma metabolizada, numa dose suficientemente elevada para poder exercer efeito biológico (Galvano, 2008). Os polifenóis têm biodisponibilidade limitada e podem ser extensamente metabolizados, no entanto, apesar desta limitação, estudos efetuados em humanos sugerem que mesmo essa pequena quantidade absorvida possa ser suficiente para exercer efeitos benéficos na saúde (Williamson e Manach, 2005). É sabido que a concentração máxima no plasma humano raramente excede 1 mM após o consumo de 10-100 mg de um único composto fenólico, a verdade é que a maioria das classes fenólicas são suficientemente absorvidas para que lhes seja permitido exercer efeitos biológicos, sendo a concentração total no plasma demonstrativa de que os mesmos atravessam efetivamente a barreira intestinal e chegam à corrente sanguínea (Landete, 2012). Pesquisas atuais sugerem que estes compostos são absorvidos no trato gastrointestinal e estão biodisponíveis no plasma dentro de 0,5 a 4 horas após a sua ingestão, ocorrendo o pico de absorção uma hora após o seu consumo (Matsumoto, 2008; Arçari, 2009).

Os polifenóis que não forem absorvidos no intestino delgado, podem ser metabolizados pela flora intestinal, originando metabolitos passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. Por exemplo, as proantocianidinas têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal seja muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Williamson e Manach, 2005). Esta metabolização pela flora intestinal tem sido pouco estudada mas pode ter um efeito considerável nas atividades biológicas dos polifenóis, uma vez que para além de poder ser fundamental para a sua absorção pode igualmente ser moduladora da sua atividade biológica (Lima, 2011; Gonçalves, 2012).

Uma vez absorvidos, os polifenóis ou os seus metabolitos, podem entrar na corrente sanguínea e serem excretados através da urina, ou podem chegar novamente ao intestino, através da circulação enterohepática, como componentes da biliar, podendo ser novamente absorvidos ou excretados pelas fezes. A estrutura/tamanho da molécula é um fator que tem influência na eliminação do composto. Assim, os compostos de menor peso molecular, são em princípio mais facilmente absorvidos, sendo a sua eliminação realizada pela urina ou pela biliar. Os compostos fenólicos com elevado peso molecular e alto grau de polimerização, que não sofram ação enzimática no trato gastrointestinal e sejam resistentes à degradação pela microflora colónica (como os taninos insolúveis), são excretados nas fezes (Manach *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2008; citado por Jardini, 2010).

Os polifenóis existentes na dieta podem, mesmo não sendo absorvido pelo epitélio intestinal, executar as suas funções benéficas no próprio intestino, desativando espécies oxidativas que se encontrem ou se formem ao longo do tubo digestivo, impedindo, desta forma, que elas possam vir a exercer os seus efeitos deletérios.

Depois de absorvidos, ou ainda nas células do intestino, os polifenóis podem sofrer metabolização pelas enzimas de biotransformação, mediada quer por enzimas da fase I, em particular pelos citocromos P450, quer pelas enzimas da fase II, como, por exemplo, sulfotransferases, glucuroniltransferases ou metiltransferases (Gonçalves, 2012). Por exemplo, os ácidos fenólicos são amplamente conjugados com o ião sulfato e com o ácido glucurónico, sendo que o grau de conjugação irá variar de acordo com as características químicas de cada um destes ácidos (Lima, 2008). Os produtos da conjugação com o ácido glucurónico podem ser descarregados pela biliar no intestino, sofrer a ação das enzimas bacterianas (especialmente da  $\beta$ -glucuronidase) e serem novamente reabsorvidos (Stahl *et al.*, citado por Jardini, 2010).

A figura 1.15 esquematiza todos os passos que ocorrem após a ingestão dos polifenóis.



**Figura 15.15** - Esquema sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos no organismo (Stahl *et al.*, 2002).

### 1.11. Ensaios *in vitro*

Do exposto no ponto anterior é possível concluir que entre a sua ingestão e a chegada ao seu local de ação (tecido ou órgão alvo), os compostos fenólicos presentes nos alimentos podem sofrer múltiplas alterações estruturais, quer no decurso da digestão gastrointestinal, quer pela ação das enzimas de biotransformação. Todas estas transformações afetam a sua estrutura podendo, conseqüentemente, afetar os seus possíveis efeitos benéficos. Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* realizados com os alimentos podem não ser necessariamente relevantes para a situação *in vivo*, uma vez que não levam em linha de conta os efeitos da digestão gastrointestinal ou da biotransformação.

Atualmente, têm sido desenvolvidos diversos métodos de digestão *in vitro*, que possibilitam estudar mudanças estruturais, digestibilidade alimentar e libertação de componentes alimentares sob condições simuladas, fornecendo uma alternativa aos ensaios de digestão *in vivo* que, apesar de bastante precisos, são dispendiosos, demorados e têm diversas restrições éticas (Papadopoulou e Frazier, 2004; Wilfart *et al.*, 2008; Hur *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012); citado por Antunes, 2012). A grande parte dos ensaios *in vitro* baseia-se na fisiologia do trato gastrointestinal, simulando as condições da digestão humana e recorrendo, para isso, a soluções artificiais que simulam o meio de cada compartimento digestivo. Contudo, os resultados obtidos com os modelos *in vitro* são muitas vezes distintos dos que se obtêm com modelos *in vivo* maioritariamente devido às dificuldades em simular com precisão os processos físico-químicos e fisiológicos altamente complexos que ocorrem (Hur *et al.*, 2011). Tais modelos terão de ser bastante dinâmicos e ter em conta diversos aspectos (a atividade enzimática, a composição iónica, o tempo de digestão, o pH da amostra e do meio digestivo, entre outros), tentando mimetizar ao máximo o que se passa *in vivo*, sabendo-se já que, normalmente, *in vitro* os processos se dão bem mais facilmente, sendo necessário então um compromisso entre a precisão e a facilidade de utilização do modelo *in vitro* em questão (Hur *et al.*, 2011; citado por Antunes, 2012).

## 1.12. Enquadramento e Objetivos

Múltiplos ensaios *in vitro* têm vindo a mostrar a existência nas maçãs de compostos com intensa actividade antioxidante, atividade esta que pode ser importante na prevenção de doenças crónicas. No entanto, para poder ter uma melhor ideia sobre a possibilidade de manutenção dessas atividades *in vivo* tornam-se necessários mais estudos, nomeadamente estudos sobre a biodisponibilidade, bioassimilação e biotransformação dos compostos que, quando se encontram embutidos na matriz da fruta, são responsáveis pelas propriedades bioativas das maçãs (Boyer e Liu, 2004).

Este trabalho teve, assim, por objetivo estudar a biodisponibilidade dos antioxidantes nas cultivares de maçã, Janagold, Golden Delicious e Royal Gala produzidas em Portugal. Para isso efetuou-se uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal e estudou-se o impacto deste procedimento na capacidade antioxidante e no teor em fenóis e flavonóides totais das várias amostras de maçã. Para poder ter uma melhor noção da forma como a digestão vai alterando os compostos responsáveis pela actividade antioxidante das maçãs, foram retiradas amostras após o processo de simulação da digestão gástrica e no final da simulação da digestão gastrointestinal.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Elaborar para cada uma das variedades de maçã em estudo uma simulação da digestão gástrica, uma simulação da digestão gastrointestinal e um extracto em acetona (actividade antioxidante total).
2. Quantificar os compostos fenólicos e, em particular, os flavonóides no extrato em acetona e nas amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal.
3. Determinar a capacidade antioxidante no extrato em acetona e nas amostras obtidas após simulação da digestão gástrica e gastrointestinal, de modo a conferir qual o impacto do processo digestivo nas propriedades bioativas das distintas variedades de maçã. Não havendo nenhum método padrão validado que possa avaliar todos os possíveis mecanismos de atividade antioxidante, esta foi avaliada através da conjugação de diversos dos métodos existentes, que detetam diferentes *endpoints*: capacidade de redução do cobre; capacidade de redução do ferro, capacidade de sequestro dos radicais anião superóxido, hidroxilo e DPPH.
4. Comparar as diferentes amostras entre si relativamente à sua capacidade antioxidante e ao conteúdo em compostos fenólicos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes e enzimas

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e enzimas: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%), acetato de sódio tri-hidratado (Panreac, 99%), acetona (Panreac, 99,9%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido L(+)-ascórbico (Panreac, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido gálico monohidratado (Merck, 99,5%), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Acros, 98%), ácido tricloroacético (Riedel-de Haën, 99,5%), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99%), azul de nitrotetrazólio (NBT<sup>2+</sup>) (Sigma), bicarbonato de sódio (Panreac, 99%), bílis bovina desidratada (Sigma B3883), carbonato de sódio (VReis), (+)-catequina monohidratada (Sigma  $\geq 96\%$ ), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), desoxirribose (Sigma, 99%), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), nitrito de sódio (Merck, 99%), pancreatina de pâncreas de porco (Sigma P3292), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma, P7125, Lote 030M15711V), peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Panreac, 30%), radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) (Sigma-Aldrich), reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac), sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99%), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%). Na preparação de todas as soluções e diluições utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

### 2.2. Aquisição das maçãs

As maçãs utilizadas no ensaio pertenciam às variedades Golden Delicious, Jonagold e Royal Gala. Todas as maçãs foram produzidas em Portugal e adquiridas no comércio de Lisboa. No momento da compra e da preparação das amostras todas as maçãs se encontravam no estágio de maturação próprio para o consumo *in natura*.

### 2.3. Preparação das amostras

As maçãs (6 de cada variedade) foram lavadas em água corrente, passadas por água ultrapura (Mili Q) e secas em papel. Em seguida, retiraram-se os caroços e fatiaram-se as polpas dos frutos sem se retirar a pele. As maçãs assim preparadas foram pesadas, colocadas num copo misturador (Electric Co) juntamente com água Mili Q acidificada a pH 2 (0,3 mL de água por cada grama de maçã) e trituradas até formar uma pasta homogénea. A água



adicionada foi pesada antes de ser introduzida no copo misturador. Foi necessária adição de água para que o liquidificador conseguisse triturar devidamente as maçãs e utilizou-se água acidificada por forma a tentar minimizar a atividade da polifenoloxidase. Imediatamente após a trituração, a pasta obtida foi distribuída por nove frascos de vidro tipo Schott de 100 mL (5 g por frasco), tendo-se então procedido à preparação dos extratos em acetona e às simulações das digestões gástrica e gastrointestinal. Todos os procedimentos foram efectuados em triplicado.

### **2.3.1. Preparação dos extratos em acetona**

Os extratos em acetona foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Serra *et al.*, (2010). Assim aos frascos contendo os 5 g de maçã triturada adicionou-se uma solução de acetona a 80% numa proporção peso/volume de (1:2). A acetona parece ser um bom solvente para a preparação de extratos de maçã devido a desnaturar rapidamente a enzima polifenoloxidase. Em seguida, os frascos contendo as amostras, foram colocados em agitação ao abrigo de luz durante 30 minutos. Findo este tempo as amostras foram centrifugadas (11 000 rpm, 30 minutos e a 4°C), filtradas (Millipore Millex GP com poro de 0,22 µm), aliquoteadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas a -60 °C.

### **2.3.2. Simulação da digestão gástrica**

Para a simulação da digestão gástrica seguiu-se o procedimento descrito por Briones-Labarca *et al.*, (2011). Assim, aos frascos contendo os 5 g de maçã triturada adicionaram-se 25 mL de água e ajustou-se o pH a 2 com uma solução de HCl 1M. Em seguida adicionaram-se 50 µL de solução de uma solução de pepsina (50 mg/mL em HCL 0,1 N) por cada mililitro de amostra. As amostras incubadas ao abrigo da luz, durante 2 horas, com uma agitação de 100 rpm e à temperatura de 37°C. Findo este tempo as amostras foram centrifugadas (11 000 rpm, 30 minutos e a 4°C), filtradas (Millipore Millex GP com poro de 0,22 µm), aliquoteadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas a -60 °C. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo (branco da digestão gástrica), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultra-pura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras.

### **2.3.3. Simulação da digestão gastrointestinal**

Para a simulação da digestão gastrointestinal seguiu-se o procedimento descrito por Briones-Labarca *et al.*, (2011). As amostras foram preparadas conforme o descrito no ponto anterior para a preparação da digestão gástrica. Após a incubação com pepsina, acertou-se o

pH das amostras a 6,0 recorrendo a uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  1 M e adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de uma solução mista de pancreatina e bÍlis (4 mg de pancreatina e 24 mg de bÍlis/mL em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M). As amostras foram novamente incubadas ao abrigo da luz, durante 2 horas, com uma agitação de 60 rpm e à temperatura de 37°C. Findo este tempo as amostras foram centrifugadas (11 000 rpm, 30 minutos e a 4°C), filtradas (Millipore Millex GP com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ ), aliquotadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas a -60 °C. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo (branco da digestão gastrointestinal), em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultra-pura, tendo o restante procedimento sido exatamente idêntico ao descrito para as amostras.

## **2.4. Determinação dos fenóis totais - Método de Folin-Ciocalteu**

### **2.4.1. Princípio do método**

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras foi realizada através do ensaio colorimétrico de Folin-Ciocalteu, um método operacionalmente simples, sensível e reprodutível (Prior *et al.*, Magalhães *et al.*, 2008). O mecanismo básico deste método reside na capacidade dos compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, reduzirem o heteropolianíon molibdotungnosteniofosfórico (coloração amarela) presente no reagente de Folin-Ciocalteu, produzindo uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com coloração azul. Desta forma, a leitura da absorvância a 765 nm, permite a quantificação dos compostos redutores presentes na amostra, pois a intensidade da coloração azul desenvolvida é proporcional ao seu teor. A reação ocorre em meio alcalino, obtido pela adição de carbonato de sódio em solução saturada. O ácido gálico é utilizado como composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG), normalmente mg/L (Magalhães *et al.*, 2008; Antunes, 2012).

O ensaio é considerado simples, no entanto é sensível e moroso, determinando apenas antioxidantes hidrofílicos (não sendo aplicável a matrizes e compostos lipofílicos) (Magalhães *et al.*, 2008), não sendo um método específico, apresenta a desvantagem de determinar também outras substâncias redutoras adicionadas ou naturalmente presentes como açúcares, compostos de enxofre, ácido ascórbico e outras vitaminas, ácidos orgânicos, iões inorgânicos como Cu(I) e Fe(II), tióis, entre outros (Magalhães *et al.* 2008; Rasteiro, 2012).

### **2.4.2. Procedimento experimental**

O procedimento de determinação dos compostos fenólicos totais realizado foi adaptado a partir de um método já publicado (Koşar *et al.*, 2008), com algumas modificações. Assim, em

balões volumétricos de 10 mL, contendo cerca de 6 mL de água ultrapura, adicionou-se o volume adequado de cada amostra ou das suas diluições (extratos em acetona, amostras após digestão gástrica e após digestão gastrointestinal e respectivos controlos das digestões), 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição e deixou-se um minuto à temperatura ambiente. Findo este tempo adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e perfez-se o volume a 10 mL com água ultrapura. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro, tendo-se em seguida procedido à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 0,5 e os 5 mg/L. Para a quantificação dos fenóis presentes nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% igual ao existente nas amostras. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de peso fresco de maçã.

## **2.5. Determinação dos flavonóides totais**

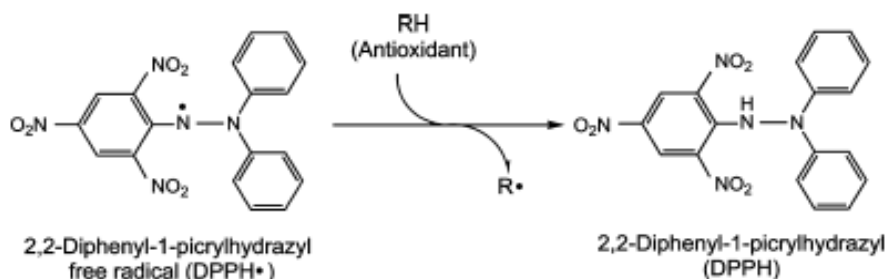
Para a determinação dos flavonóides totais utilizou-se o procedimento descrito por Barros *et al.* (2010). Assim, uma alíquota de cada amostra foi misturada água até perfazer 2 mL. Em seguida adicionaram-se 150 µL de uma solução nitrito de sódio (5%) 6 minutos depois 150 µL de uma solução cloreto de alumínio (10%). Após mais 6 minutos adicionaram-se 2 mL de NaOH (4%) e água até perfazer os 5 mL. As amostras assim preparadas foram incubadas durante 15 minutos no escuro, tendo-se em seguida procedido à medição da sua absorvância num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 510 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em flavonóides sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de catequina com concentrações entre os 4,5 e os 290 mg/L. Para a quantificação dos flavonóides presentes nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% igual ao existente nas amostras. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de catequina por grama de peso fresco de maçã.

## 2.6. Determinação da capacidade antioxidante

### 2.6.1. Capacidade de Sequestro do radical DPPH•

### 2.6.1.1. Princípio do método

O método de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) foi sugerido primeiramente em meados da década de cinquenta, originalmente para descobrir doadores de hidrogénio em produtos naturais, e, mais tarde, para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos individuais e de alimentos. Atualmente é um dos métodos mais utilizados para verificação da atividade antioxidante (Tiveron, 2010). Este método, simples e altamente sensível, baseia-se na mudança da cor púrpura para amarelo que ocorre quando o radical DPPH<sup>•</sup> é desativado ao receber um hidrogénio de um antioxidante ou ao ser reduzido (Figura 2.1) (Bergamaschi, 2010).



**Figura 2.16 - Reacção de desativação do radical DPPH• (Moon e Shibamoto, 2009).**

### 2.6.1.2. Procedimento experimental

O procedimento do ensaio DPPH<sup>\*</sup> foi adaptado a partir de um método já publicado (Miceli *et al.*, 2009), com algumas modificações. Para tal, em tubos de ensaio, misturaram-se 500 µL de cada uma das amostras, ou de suas diluições, com 3 mL de uma solução de DPPH<sup>\*</sup> (24 mg/L em etanol). As diversas misturas foram agitadas, tendo-se medido a absorvância a 517 nm (espectrofotômetro SPEKOL 1500) após 30 minutos de incubação no escuro e à temperatura ambiente. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo para cada amostra sido determinada a percentagem de sequestro através da equação:

$$\% \text{Inibição} = [( \text{Absorv\~ancia sem amostra} - \text{Absorv\~ancia com amostra} ) / ( \text{Absorv\~ancia sem amostra} )] \times 100$$

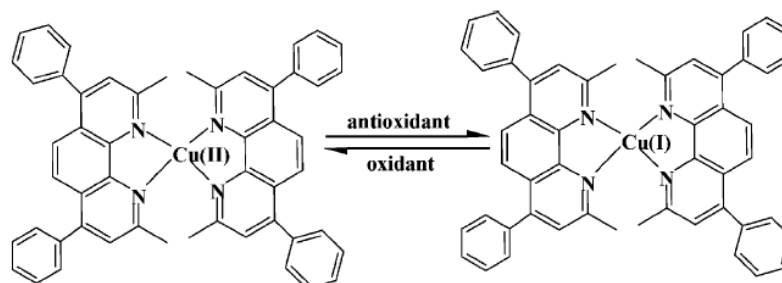
A capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> das amostras foi expressa mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por 100 g de peso fresco de maçã, após interpolação de

uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido ascórbico com concentrações entre os 0,02 e 0,035 mg/mL. Para a determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% igual ao existente nas amostras.

## 2.6.2. Avaliação da capacidade de redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

### 2.6.2.1. Princípio do método

O método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) através da ação de antioxidantes redutores, presentes numa amostra. Esta reação origina um complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) na forma reduzida, que apresenta uma coloração intensa, com um máximo de absorção a 450 nm (Figura 2.2). Como tal, a redução da forma oxidada do complexo referido pelos componentes da amostra é determinada espectrofotometricamente, mediante a leitura da absorvância a 450 nm. Este método simples, rápido, reprodutível e sem necessidade de muitos aparelhos (Apak *et al.*, 2004). Os prótons libertados na reação entre os polifenóis e este complexo, são tamponados por uma solução de acetato de amónio (Apak *et al.*, 2004). O ácido ascórbico é utilizado como composto padrão de referência, sendo os resultados expressos em equivalentes de ácido ascórbico (EAA), normalmente µmol/g de amostra (Lima, 2011; Antunes, 2012).



**Figura 2.2** - Redução do complexo Cu(II)–neocuproína a Cu(I)–neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (Apak *et al.*, 2004).

### 2.6.2.2. Procedimento experimental

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004) com adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1M e neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionaram-se 100 µL de amostra, ou de suas diluições, e completou-se a 4100 µL com água. Os tubos foram incubados ao abrigo da

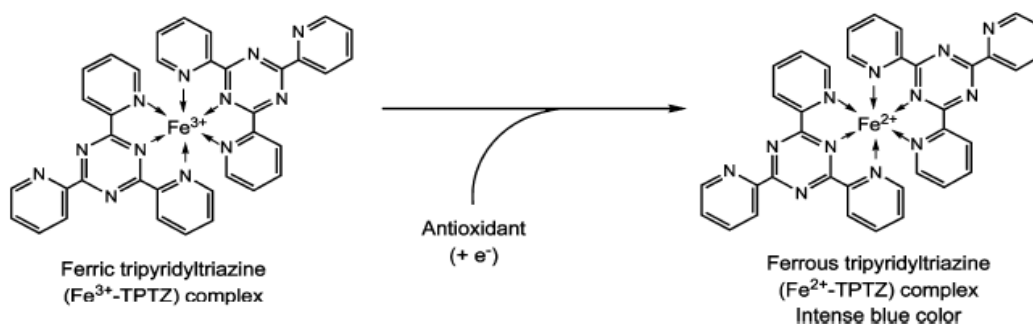
luz durante 1 hora à temperatura ambiente procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotômetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água em vez da amostra. As amostras foram analisadas em triplicado tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico com concentrações entre os 15,625 e os 250  $\mu\text{M}$ . Para a determinação da atividade CUPRAC nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% igual ao existente nas amostras. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  equivalentes de ácido ascórbico/g de peso fresco de maçã.

### 2.6.3. Determinação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

#### 2.6.3.1. Princípio do método

O método do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), baseia-se em reações de transferência de elétrons. Segundo alguns autores, esta metodologia foi desenvolvida como alternativa para análise de fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros e pode ser aplicada tanto para estudos da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, como em substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias (Tiveron, 2010).

Este método baseia-se na capacidade dos antioxidantes reduzirem o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Quando essa redução ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e em condições ácidas a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso), com uma absorção máxima a 593 nm (Figura 2.3) (Bergamaschi, 2010).



**Figura 2.3 - Formação do complexo ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) após redução do  $\text{Fe}^{3+}$  por um antioxidante (Moon e Shibamoto, 2009).**

Este método apenas consegue detetar antioxidantes capazes de ceder eletrões não sendo detetados aqueles que têm por mecanismo de acção a transferência de átomos de hidrogénio. Este método não consegue, igualmente, detetar antioxidantes com o grupo tiol, como, por exemplo, o glutatono (Apak *et al.*, 2004). Qualquer composto presente na amostra, mesmo que não tenha nenhuma acção antioxidante, desde que tenha um potencial redox superior ao do par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  pode, teoricamente, reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  e, deste modo, contribuir para uma avaliação por excesso das capacidades antioxidantes da amostra (Magalhães *et al.*, 2008).

### **2.6.3.2. Procedimento experimental**

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Ramful e colaboradores (2010) com certas modificações. Preparou-se o reagente FRAP no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6); 2,5 mL de TPTZ (10mM em HCl 40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) (20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37° C, com 300 µL de água e 100 µL de cada uma das amostras ou das suas diluições. As misturas foram incubadas no escuro durante 4 minutos a 37° C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm (num espectrofotómetro SPEKOL 1500), utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

As amostras foram analisadas em triplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0,25 e os 1,25 mM. Para a determinação da capacidade da atividade FRAP nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% igual ao existente nas amostras. Os resultados foram expressos em µmol de  $\text{Fe}^{2+}$ /g de peso fresco de maçã.

### **2.6.4. Determinação da atividade antioxidante por sequestro do radical hidroxilo através da diminuição da degradação da desoxirribose**

#### **2.6.4.1. Princípio do método**

A degradação da desoxirribose pelo radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) leva à formação de diversos produtos, entre os dos quais se encontra o malonildialdeído (MDA), que em meio ácido e a temperatura elevada, reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) dando origem a compostos cor-de-rosa passíveis de serem quantificados espectrofotometricamente por medição da absorvância a 532 nm (Figura 2.4). Neste ensaio utiliza-se a reação de Fenton (Figura 2.5)

para gerar o radical hidroxilo, necessário para esta reação. Desta forma, qualquer molécula capaz de sequestrar  $\text{OH}^\bullet$ , ou prevenir a sua formação por desativação da molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (transformando-a em  $\text{H}_2\text{O}$ ) irá conduzir a uma diminuição da formação dos compostos corados, visto que à medida que são formados os radicais são imediatamente neutralizados, existindo uma competição entre a desoxirribose e os antioxidantes existentes no meio reacional. Assim, pode determinar-se a capacidade da amostra para sequestrar o radical  $\text{HO}^\bullet$  através da medição da diminuição da absorvância a 532 nm. A reação ocorre em meio ácido, obtido pela adição do ácido tricloroacético (Magalhães *et al.*, 2008; Chobot, 2010).

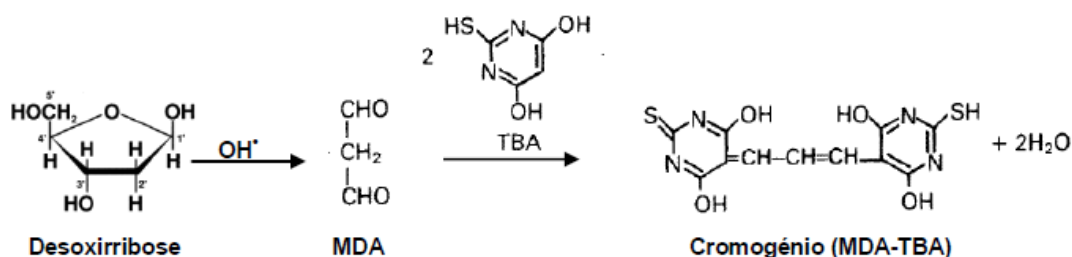


Figura 2.4 - Reação de formação dos compostos MDA-TBA (adaptado de Chobot, 2010).

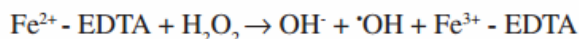
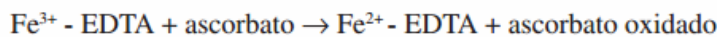


Figura 2.5 – Formação do radical hidroxilo através da reação de Fenton (Filgueiras *et al.*, 2009).

A formação do complexo Fe-EDTA impede a formação de complexos entre o ferro e outras substâncias presentes nas misturas de ensaio, não impedindo a participação do ferro na reação de Fenton (Chobot, 2010). Quando o ensaio é realizado na ausência de EDTA a desoxirribose pode quelar o  $\text{Fe(III)}$  o que origina uma maior degradação desta molécula, devido à síntese *site specific* dos radicais hidroxilo (Chobot, 2010).

#### 2.6.4.2. Procedimento experimental

O procedimento de determinação da capacidade de sequestro do radical  $\text{OH}^\bullet$  através da determinação da diminuição da degradação da desoxirribose foi adaptado a partir de um



método já publicado (Chobot, 2010). As determinações foram efetuadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500), a 532 nm. Em tubos de ensaio adicionou-se pela seguinte ordem 690 µL de tampão de fosfatos de potássio (15 mM, pH 7,4), 25 µL de amostra, 100 µL de desoxirribose (28 mM), 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (28,4 mM), 50 µL de solução de FeCl<sub>3</sub>/EDTA (FeCl<sub>3</sub> 400 µM dissolvido em 2mM de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O) e por fim, 10 µL de ácido ascórbico 5 mM, perfazendo com o solvente da amostra a um volume final de 1 mL. Esta mistura reacional foi incubada a 37°C durante uma hora. Após esse período, adicionou-se 1 mL de solução de TBA (1% p/v em NaOH 50 mM) e 1 mL de ácido tricloroacético (2,8% p/v). A solução resultante foi aquecida durante 15 minutos, em banho de água, a 100°C. Terminado o tempo de incubação, a amostra foi sujeita a um arrefecimento, com posterior leitura da absorvância a 532 nm. Realizou-se, igualmente, um branco, contendo todos os componentes da mistura reacional substituindo a desoxirribose por igual volume de água, a fim de averiguar a existência de produtos TBA reativos, provenientes de contaminantes presentes no material ou reagentes. Efetuou-se, igualmente, um controlo positivo, contendo todos os componentes da mistura reacional, substituindo a amostra por igual volume de água.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da formação de produtos reativos face ao TBA por mg de peso fresco de maçã. A percentagem de inibição foi calculada relativamente ao controlo positivo, calculada recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [( \text{Absorvância controlo positivo} - \text{Absorvância amostra} ) / ( \text{Absorvância controlo positivo} )] \times 100$$

## **2.6.5. Capacidade de sequestro do radical anião superóxido**

### **2.6.5.1. Princípio do método**

Para determinação da capacidade antioxidante das amostras em estudo em função do sequestro de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> utilizou-se o método colorimétrico de diminuição da formação de formazano, um método operacionalmente moroso mas bastante sensível e com grande importância biológica uma vez que o radical anião superóxido pode formar-se *in vivo* no decurso dos processos metabólicos (Magalhães *et al.*, 2008). O radical do anião superóxido reage com o NBT<sup>2+</sup>, reduzindo-o a formazano (Figura 2.6). Este composto apresenta uma coloração azul, com um máximo de absorção a 560 nm. Desta forma, qualquer molécula com a capacidade de sequestrar o radical anião superóxido pode dar origem a uma diminuição da velocidade de redução do NBT<sup>2+</sup>, que se traduz por uma diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm. Neste ensaio, o radical anião superóxido foi gerado pelo sistema PMS e pelo NADH: o PMS, após ter sido reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio, produzindo o radical do anião superóxido. A reação ocorre em meio neutro, obtido pela adição de tampão fosfatos. O ácido gálico é utilizado como controlo positivo de referência (Antunes, 2012).

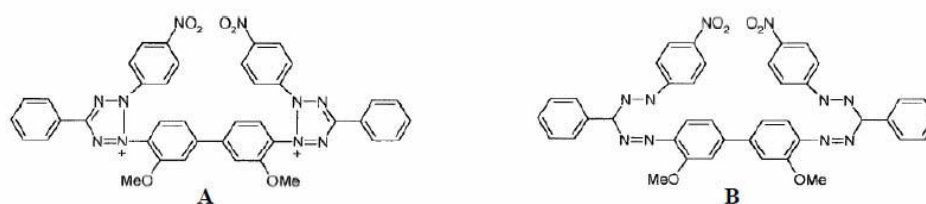


Figura 2.6 - Estrutura do (A) NBT<sup>2+</sup> e do (B) formazano (Valentão *et al.*, 2001).

### 2.6.5.2. Procedimento experimental

O procedimento de determinação da capacidade sequestrante de  $O_2^{\cdot -}$  pela diminuição da formação de formazano foi adaptado a partir de um método já publicado (Nakamura *et al.*, 1992; Valentão *et al.*, 2001), com algumas modificações. Sendo assim, adicionaram-se em cuvetes do espectrofotómetro diferentes volumes das amostras, ou das suas diluições, de modo a testar diferentes concentrações, completando-se posteriormente com água ultra pura, até 200  $\mu$ L. Logo depois, adicionaram-se 300  $\mu$ L de NADH (1,66 mM em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4), 300  $\mu$ L de NBT<sup>2+</sup> (430  $\mu$ M, em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4) e tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) a fim de se completar o volume a 2 950  $\mu$ L. A reação iniciou-se com a adição de 50  $\mu$ L de PMS (162  $\mu$ M, em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4) acompanhando-se a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra. As determinações foram realizadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT<sup>2+</sup> de cada uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = \frac{[(\text{Declive médio do controlo} - \text{Declive médio da amostra})/(\text{Declive médio do controlo})] \times 100}$$

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido das amostras foi expressa mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de peso fresco de maçã, após interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 0,005 e 0,078 mM. Para a determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido nos extratos em acetona adicionou-se aos padrões um volume de acetona a 80% igual ao existente nas amostras.

## **2.7. Análise estatística dos resultados**

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi efetuado recorrendo ao *software* Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, Washington). Em todos os testes-t elaborados foi utilizado um nível de significância de 0,05.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Determinação do teor em fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado com recurso ao método Folin-Ciocalteu e os resultados obtidos expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de peso fresco de maçã. Os resultados referentes à composição em compostos fenólicos totais das amostras em estudo encontram-se na Figura 3.1. As três variedades de maçãs apresentaram entre si diferenças significativas no teor em fenóis totais sendo a variedade Jonagold a que apresenta o teor mais elevado e a variedade Royal Gala o teor mais baixo. Estes valores podem resultar de diferenças genéticas entre as variedades, das diferentes condições de solo e clima ou das práticas agrícolas (densidade de plantação, fertilização, irrigação e tratamentos antipragas) utilizadas na sua produção. Com efeito, é sabido que todos estes fatores podem influenciar o teor em fenóis totais dos frutos (Azuantegui, 2009). O resultado obtido com os brancos das digestões mostraram a existência, nas soluções enzimáticas utilizadas, de compostos capazes de reduzir o reagente de Folin, no entanto os resultados foram muito baixos quando comparado com o das amostras e, deste modo, pode considerar-se esta interferência negligenciável.

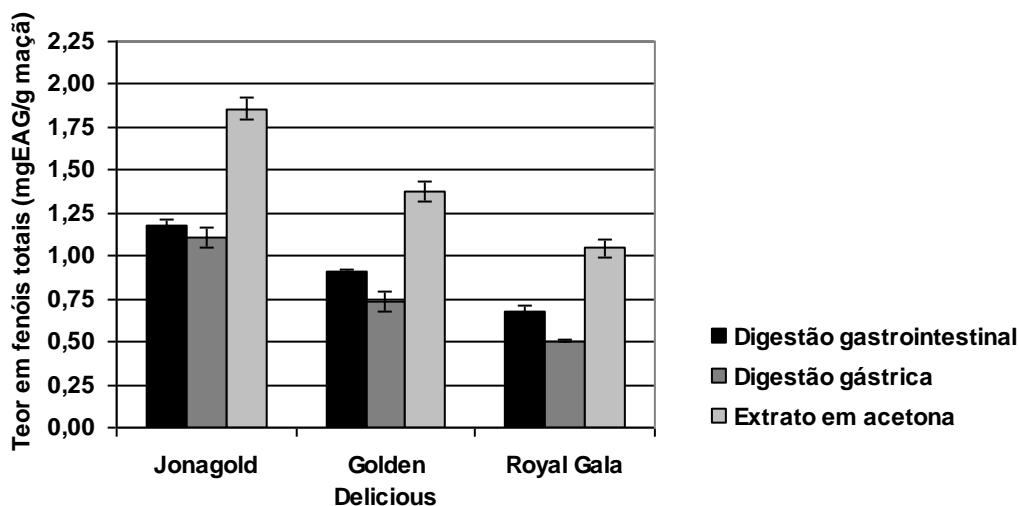


Figura 3.1 – Teor em compostos fenólicos totais das amostras em estudo.

A observação da figura 3.1 permite verificar a existência de um decréscimo do teor em compostos fenólicos totais após a simulação da digestão, tanto gástrica como gastrointestinal, apresentando as amostras digeridas teores de fenóis totais significativamente inferiores aos

dos extratos em acetona. Esta observação aponta no sentido de durante a digestão das maçãs não se conseguir obter uma libertação completa dos compostos fenólicos presentes nos frutos ou de uma parte destes compostos ser degradada nas condições digestivas. Os resultados mostram ainda que a maioria dos compostos fenólicos é solubilizada durante a digestão gástrica, ocorrendo no entanto um aumento gradual e significativo para as variedades Golden e Royal Gala, do teor em compostos fenólicos da digestão gástrica para a digestão gastrointestinal. Este aumento pode estar relacionado com o aumento do tempo de extração e/ou com a atividade das enzimas pancreáticas. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores com diversas variedades de maçãs cultivadas no Luxemburgo (Bouayed *et al.*, 2011). De acordo com os resultados obtidos, após a digestão gastrointestinal cerca de 65% dos polifenóis presentes nas maçãs ficam disponíveis para poderem ser posteriormente absorvidos. O efeito da digestão gastrointestinal foi semelhante nas três variedades de maçãs em estudo.

### 3.2. Determinação do teor em flavonóides totais

O teor em flavonóides totais das amostras em estudo encontram-se na Figura 3.2. Os brancos de ambas as digestões não interferiam no ensaio. As três variedades de maçãs apresentaram entre si diferenças significativas no teor em flavonóides totais sendo a variedade Jonagold a que apresenta o teor mais elevado e a variedade Royal Gala o teor mais baixo.

A observação da figura 3.2 permite verificar a existência de um decréscimo do teor em flavonóides totais após a simulação da digestão, tanto gástrica como gastrointestinal, apresentando as amostras digeridas teores de flavonóides totais significativamente inferiores aos dos extratos em acetona. Tal como já referido no caso dos fenóis totais, também neste caso, os resultados apontam no sentido de durante a digestão das maçãs não se conseguir obter uma libertação completa dos flavonóides presentes nos frutos ou de uma parte destes compostos ser degradada nas condições digestivas.

Também em concordância com o observado para os fenóis totais, mais uma vez os resultados mostram que a maioria dos compostos fenólicos é solubilizada durante a digestão gástrica, ocorrendo no entanto um aumento gradual e significativo do teor em flavonóides da digestão gástrica para a digestão gastrointestinal. De acordo com os resultados obtidos, durante a digestão gástrica são solubilizados cerca de 30% dos flavonóides presentes nas maçãs, passando este valor para cerca de 45% para as variedades Jonagold e Golden e cerca de 60% para a variedade Royal Gala após a digestão gastrointestinal. Desta forma, os resultados sugerem, que os flavonóides presentes na variedade Royal Gala sejam mais facilmente extraídos ou sejam mais estáveis nas condições da digestão gastrointestinal.

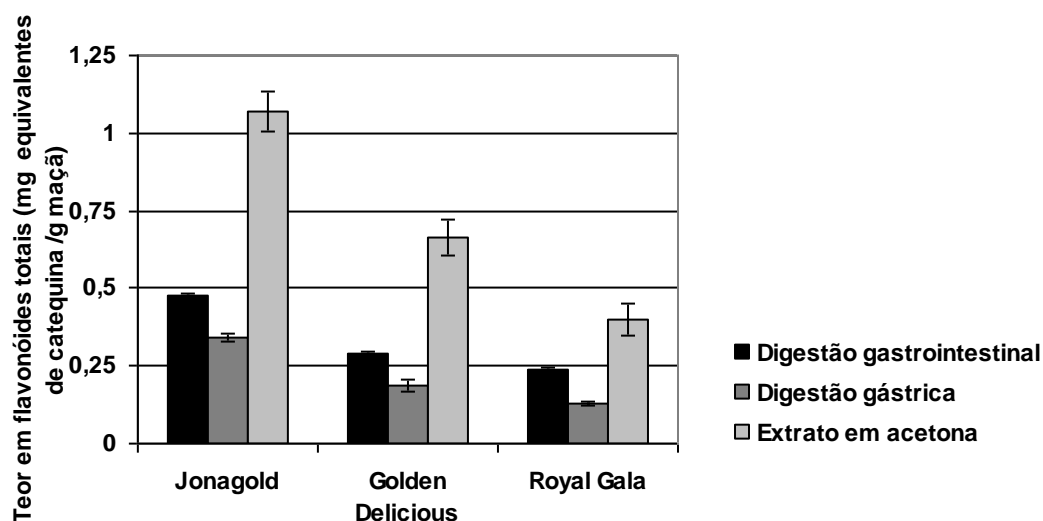


Figura 3.2 - Teor em flavonóides totais das amostras em estudo.

### 3.3. Determinação da Capacidade Antioxidante

É notório o crescimento de pesquisas científicas relacionadas com os antioxidantes, assim como o número de métodos desenvolvidos que permitem medir a sua atividade. É sabido que existem diversas formas de antioxidantes nos sistemas biológicos, que podem atuar por diferentes mecanismos consoante o sistema de reação. Devido a estes fatores, nenhum ensaio poderá detectar simultaneamente todos os antioxidantes de um sistema complexo.

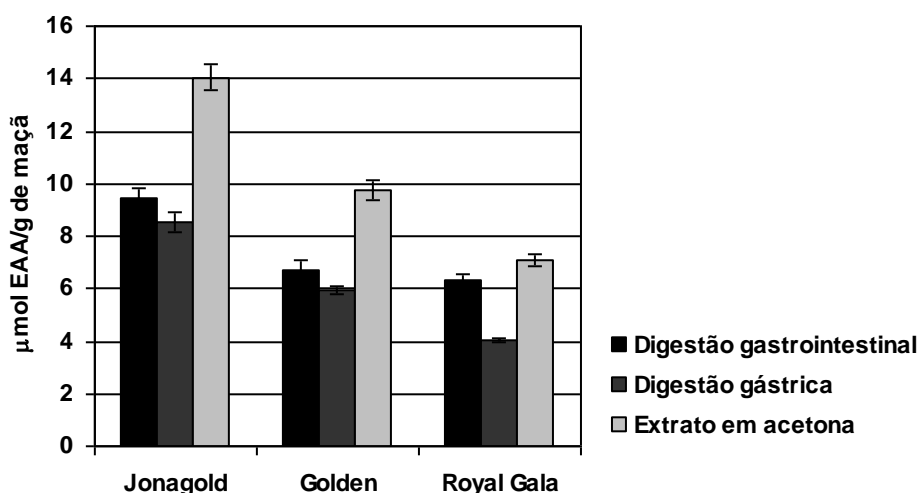
A capacidade antioxidante das maçãs antes e após simulação da digestão gastrointestinal foi avaliada recorrendo a dois ensaios de determinação da capacidade redutora (ensaio CUPRAC e FRAP), capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> e capacidade de sequestro de duas das principais ROS que podem formar-se *in vivo*: os radicais anião superóxido e hidroxilo.

#### 3.3.1. Avaliação da redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC

Verificou-se que os brancos tanto da digestão gástrica como da digestão gastrointestinal não interferiram no ensaio, ou seja, as várias enzimas e sais biliares não possuem, nas concentrações adicionadas, compostos positivamente interferentes com o método em questão.

A análise da capacidade antioxidante das distintas variedades de maçã pelo ensaio CUPRAC (Figura 3.3) permitiu verificar a existência de diferenças significativas entre os tratamentos, tanto antes como depois das digestões simuladas, tendo as maçãs da variedade Jonagold apresentado uma atividade antioxidante mais elevada comparativamente às duas outras variedades estudadas (Royal Gala e Golden). Este resultado está em concordância com os resultados obtidos nos ensaios anteriores e sugere o envolvimento dos fenóis, e, em particular, dos flavonóides na atividade antioxidante detetada pelo ensaio CUPRAC

A análise da figura 3.3 permite verificar que nem todos os compostos responsáveis pela atividade antioxidante das maçãs, detetada pelo ensaio CUPRAC, ficaram bioacessíveis após a simulação da digestão. Com efeito, todas as variedades em estudo apresentaram valores mais elevados de CUPRAC nos extratos em acetona. Os compostos responsáveis pela atividade CUPRAC que ficaram bioacessíveis após a digestão *in vitro* das maçãs Golden e Jonagold foram maioritariamente extraídos durante a fase de digestão gástrica, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre os valores de CUPRAC após as digestões gástrica e gastrointestinal. Já no caso das maçãs Royal Gala verificou-se um aumento significativo do valor de CUPRAC após a fase intestinal o que sugere que esta última etapa da digestão *in vitro* contribua para uma melhor solubilização dos compostos antioxidantes presentes na matriz destas maçãs.



**Figura 3.3** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo ensaio CUPRAC.

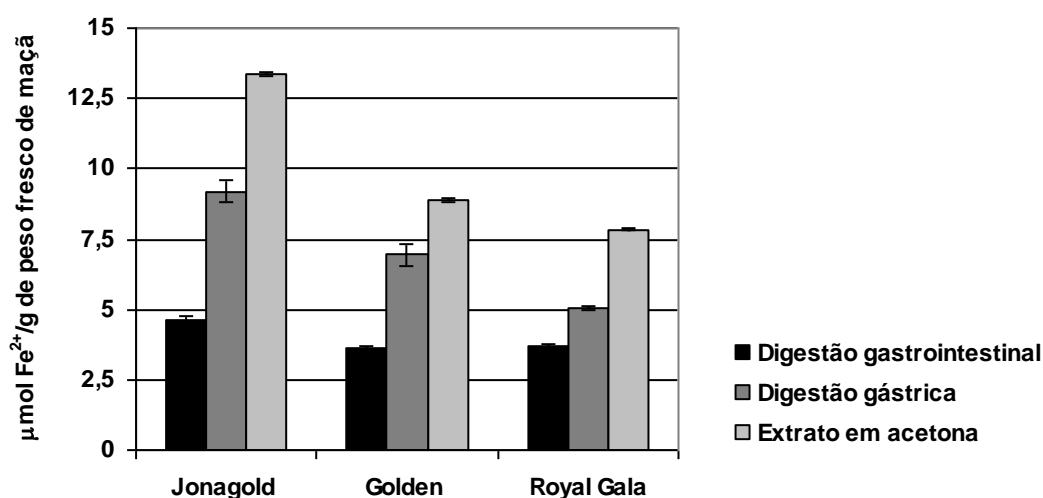
### 3.3.2. Avaliação da atividade de redução Fe(III) a Fe(II) pelo ensaio FRAP

O método de capacidade antioxidante FRAP é baseado na capacidade que em meio ácido os antioxidantes têm para reduzirem o ferro, especificamente o ferro do complexo Fe(III)-tripiriditriazina, para o estado ferroso, o que provoca uma alteração da cor do meio para azul

(Bergamaschi, 2010). O fato deste ensaio se realizar a pH ácido pode indicar que é o melhor ensaio para testar a atividade antioxidante dos extratos gástricos (Bouayed *et al.*, 2011).

Os resultados do ensaio FRAP para as variedades de maçã e para os distintos tratamentos, estão apresentados na Figura 3.4. Os brancos de ambas as digestões não interferiam no ensaio. Os valores mais elevados foram encontrados nos extratos em acetona, onde variedade Jonagold mais uma vez se destacou, provavelmente pela sua diferenciada concentração de polifenóis. Assim, tal como verificado para o ensaio CUPRAC, também neste ensaio se observou que os extratos em acetona das maçãs com maior teor de fenóis e flavonóides totais foram as que apresentaram maiores valores de FRAP, indicando que estes compostos possam contribuir significativamente para a atividade antioxidante detectada por este ensaio.

Os tratamentos digestivos gástrico e gastrointestinal, apresentam, para as três variedades, uma redução da atividade antioxidante em relação aos extratos em acetona. Entre os tratamentos de digestão, os valores menores foram apresentados nas amostras correspondentes à simulação da digestão gastrointestinal, mostrando que a biodisponibilidade dos antioxidantes envolvidos na atividade FRAP diminui no final da digestão. Idênticos resultados foram obtidos por outros autores com maçãs cultivadas no Luxemburgo (Bouayed *et al.*, 2011). A comparação do teor em fenóis e em flavonóides obtidos com a atividade FRAP dos extratos após a simulação da digestão gastrointestinal, sugere uma de duas coisas. Assim, os resultados sugerem ou o envolvimento de outros compostos que não os fenóis na atividade antioxidante das maçãs, ou que durante a fase intestinal ocorra uma alteração estrutural dos fenóis que diminua a sua capacidade de reduzir o Fe(III).

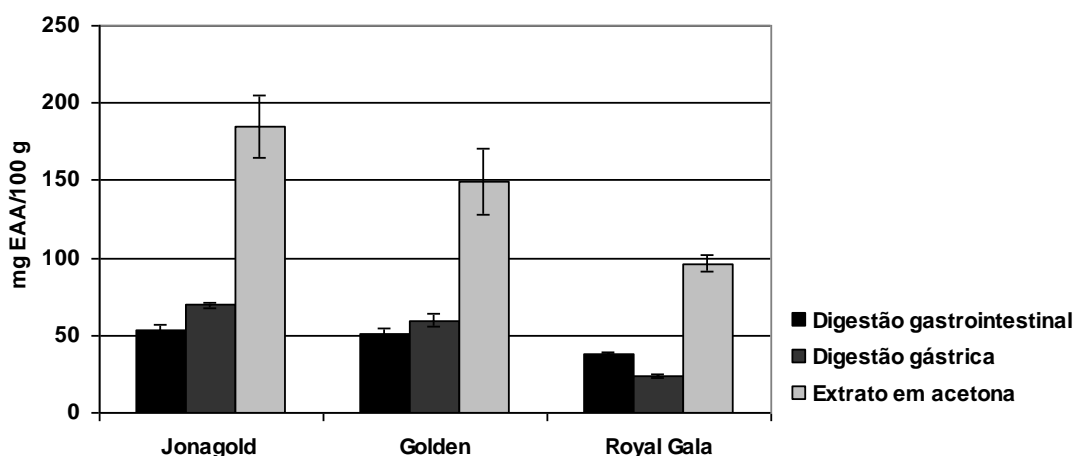


**Figura 3.4** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo ensaio FRAP.



### 3.3.3. Capacidade de Sequestro do Radical DPPH•

A capacidade de sequestrar o radical DPPH• das amostras de maçãs em estudo, encontra-se na figura 3.5. Os brancos de ambas as digestões não demonstraram nenhuma capacidade para sequestrar o radical DPPH•. A capacidade de sequestro do radical DPPH• foi superior nas amostras com mais elevado teor em compostos fenólicos (figuras 3.1 e 3.2), o que realça a contribuição destes compostos para as propriedades antioxidante das maçãs. Após a simulação das digestões gástrica e gastrointestinal foi possível verificar uma redução significativa da atividade antioxidante de todas as variedades de maçãs em estudo. Com efeito, os extratos em acetona apresentaram sempre uma atividade muito superior mostrando que os compostos antioxidante detetados neste ensaio se perdem ou se alteram durante a simulação da digestão. Os resultados obtidos mostram que a simulação da digestão exerceu um efeito diferente sobre as várias amostras em estudo. Assim, os compostos responsáveis pela atividade de sequestro do radical DPPH• das maçãs Golden foram todos extraídos durante a fase de digestão gástrica, uma vez que não se verificam diferenças significativas entre estes dois valores. Já no caso das maçãs Jonagold se verificou uma ligeira mas significativa diminuição desta atividade de sequestro entre as digestões gástrica e gastrointestinal, sugerindo que alguns dos compostos responsáveis por esta atividade se alterem e percam a sua atividade no decurso da digestão intestinal. Em relação às maçãs Royal Gala verificou-se exatamente o contrário, parecendo que a digestão intestinal contribua para uma melhor solubilização dos compostos antioxidantes presentes na matriz da fruta.



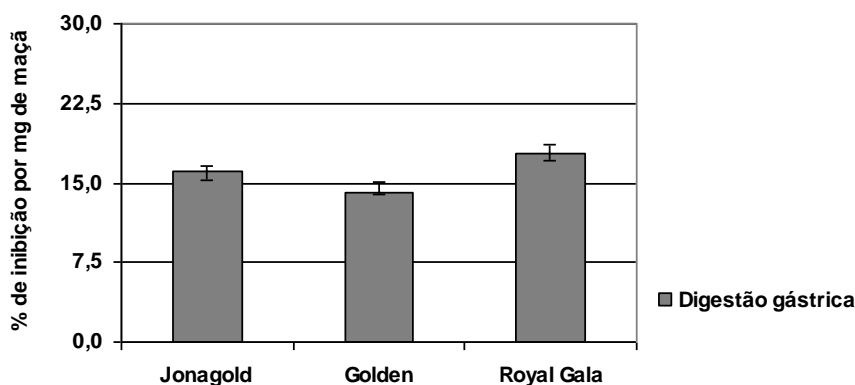
**Figura 3.5** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical DPPH•.

### 3.3.4. Capacidade de Sequestro do Radical Hidroxilo

O radical hidroxilo é um das espécies reativas de oxigénio mais deletérias, com um tempo de meia-vida muito reduzido (cerca de  $10^{-9}$  segundos nas células), este radical possui uma elevada reatividade (Filgueiras *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2010), reagindo com proteínas, ADN, ácidos gordos poliinsaturados das membranas e quase todas as moléculas biológicas, para formar espécies radicalares menos reativas (Filgueiras *et al.*, 2009). A determinação da capacidade das amostras em estudo para sequestrar o  $\text{HO}^\bullet$  constitui um ensaio com relevância fisiológica devido à possível formação deste radical em organismos aeróbios (incluindo humanos).

Neste ensaio apenas foi possível considerar os resultados obtidos com as amostras após simulação da digestão gástrica uma vez que, quer a acetona quer o branco da digestão gastrointestinal interferiram com o ensaio. No caso da acetona esta levava a uma inibição de 100%, no caso do branco da digestão gastrointestinal o valor rondava os 50% de inibição. Contudo, neste último caso, optou-se por não descontar o valor do branco às amostras uma vez que não é sabido até que ponto a presença das amostras altera a ação dos componentes do branco e vice-versa.

Os resultados da capacidade de sequestro do radical hidroxilo para as três variedades de maçã após simulação da digestão gástrica, expressos em termos de percentagem de inibição por mg de peso fresco de maçã, encontram-se na Figura 3.6. Foi possível verificar em todas as amostras a ocorrência de sequestro do radical hidroxilo, com consequente diminuição da formação do composto cromogénico MDA-TBA, e correspondente diminuição da intensidade da coloração rósea no final do ensaio. As variedades apresentaram capacidades de sequestro significativamente diferentes entre si, tendo a variedade Royal Gala sido aquela que mais se destacou seguida da Jonagold e, por fim, da Golden. Estes resultados sugerem, que para além dos compostos fenólicos, outros compostos possam estar envolvidos nesta atividade.



**Figura 3.6**

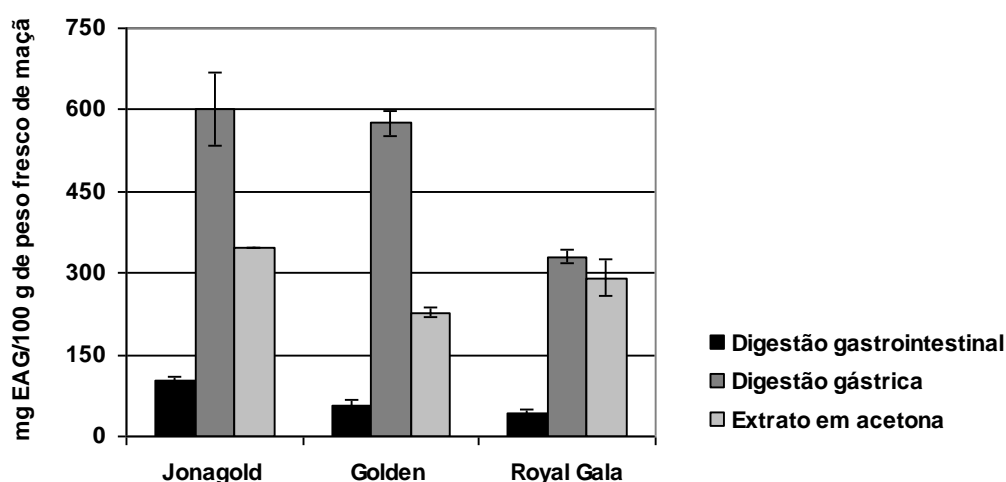
- Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical hidroxilo.

### 3.3.5. Capacidade de Sequestro do Radical Anião Superóxido

A capacidade de sequestro do radical anião superóxido é igualmente um ensaio com elevada relevância biológica dada a possibilidade de formação *in vivo* deste radical. Os brancos de ambas as digestões não interferiram no ensaio, isto é, não demonstraram nenhuma capacidade para sequestrar o radical anião superóxido.

A análise dos dados obtidos (Figura 3.7) possibilitou concluir que todas as maçãs em estudo apresentaram capacidade de sequestro do radical em questão. Os resultados mostraram ainda que a simulação da digestão intestinal levou a uma perda significativa dos compostos responsáveis por esta atividade uma vez que se verificou uma diminuição acentuada da percentagem de sequestro entre a simulação da fase gástrica e intestinal da digestão. Diversos fatores podem levar aos resultados obtidos após a digestão gastrointestinal. Segundo Bouayed *et al.* (2011), condições tais como o pH ou a interação dos compostos fenólicos com outros componentes alimentares libertados durante a digestão, como, por exemplo, os minerais, a fibra dietética ou as proteínas, podem influenciar a solubilidade e disponibilidade dos polifenóis.

Foi igualmente possível observar que a simulação da digestão gástrica foi bastante eficiente na solubilização dos compostos antioxidantes presentes nos frutos. Com efeito estes extratos apresentaram uma capacidade de sequestro do radical anião superóxido igual, no caso da variedade Royal Gala, ou superior, no caso das variedades Jonagold e Golden, à apresentada pelos extratos em acetona. Outros trabalhos mostram que, em alguns casos, a extração com solventes orgânicos pode não conseguir solubilizar todos os compostos presentes nas matrizes alimentares o que pode levar à sub-estimação de algumas atividades antioxidantes (Bhatt e Patel, 2013).



**Figura 3.7** - Capacidade antioxidante das variedades de maçã determinada pelo sequestro do radical anião superóxido.

#### 4. Conclusão

Muitos dos estudos realizados para demonstrar a existência de propriedades bioativas nos alimentos resultam da aplicação de ensaio *in vitro*. Contudo, a extrapolação desses resultados para a situação *in vivo* não pode ser imediata. Com efeito, o fato de um composto apresentar uma determinada atividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiológicas. Para que isso aconteça é necessário que ele resista ao processo de digestão gastrointestinal, que seja absorvido pelas células do intestino e que não seja rapidamente inativado nem pelas bactérias da flora intestinal, nem pelas enzimas de biotransformação humanas.

Os produtos bioativos obtidos pela dieta sofrem diferentes processos de absorção e metabolização e, por isso, uma extrapolação dos efeitos que demonstram em ensaios *in vitro* para a saúde humana deve ser efetuada com cautela, pois os compostos bioativos, e, em particular, os polifenóis, têm biodisponibilidade limitada e podem ser extensamente metabolizados. De fato, o conhecimento da biodisponibilidade e da biotransformação dos polifenóis constituem fatores chave para poder especular sobre a maior proteção contra o *stress* oxidativo que os antioxidantes presentes nos alimentos possam conferir. De acordo com alguns autores citado por Rasteiro (2012), apesar de poderem ser extensamente metabolizados e de apresentarem uma limitada disponibilidade, estudos efetuados em humanos sugerem que, após a ingestão de alimentos contendo polifenóis, é possível atingir no plasma concentrações semelhantes àsquelas em que estes exercem os seus efeitos protetores nos ensaios *in vitro*. Outro ponto importante para a manutenção *in vivo* das atividades detetadas *in vitro* reside na metabolização pela flora intestinal. Esta metabolização tem sido pouco estudada mas pode ter um efeito preponderante nas atividades biológicas dos polifenóis, uma vez que se estes não forem absorvidos no trato gastrointestinal, podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea (Williamson e Manach, 2005).

O objetivo deste trabalho residiu no estudo do efeito da simulação da digestão gastrointestinal nas propriedades antioxidantes de três diferentes variedades de maçã produzidas em Portugal. A maçã foi o fruto escolhido pelo facto de ser um dos mais produzidos em Portugal e de ser um fruto que apresenta elevado teor em compostos fenólicos bioativos, cujo impacto positivo na saúde de quem os consome, se encontra documentado em diversos ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Uma vez que não existe um método universal para a determinação da atividade antioxidante das amostras, por esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diferentes ensaios, nomeadamente, ensaios de avaliação da capacidade redutora (FRAP, CUPRAC e DPPH) e capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigénio que

podem formar-se *in vivo* (radical hidroxilo e radical anião superóxido). A análise da capacidade antioxidante recorrendo a diferentes metodologias é importante como uma forma de melhor se avaliar esta propriedade, já que não é possível afirmar que uma metodologia seja melhor que outra, uma vez que todas possuem vantagens e limitações.

Os resultados obtidos mostraram que a simulação da digestão gastrointestinal usando o fruto maçã como matriz alimentar, levaram, de um modo geral, a uma atividade antioxidante estatisticamente menor do que a obtida por extração com acetona. Este resultado demonstra que a preparação de extratos em solventes orgânicos para avaliar o potencial bioativo dos alimentos pode levar à sobrestimação desse potencial, uma vez que a quantidade de compostos bioativos que ficam biodisponíveis após a digestão pode ser menor do que a quantidade que é solubilizada pelos solventes orgânicos.

Os resultados mostraram igualmente que durante a fase gástrica da digestão ocorre a solubilização da maioria dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante das maçãs. As amostras não se comportaram da mesma forma para todas as metodologias, e não houve uma ordem de atividade antioxidante definida para todas. Assim, enquanto que nos ensaios CUPRAC e no doseamento em flavonóides e fenóis totais se verificou um ligeiro aumento entre a digestão gástrica e a gastrointestinal, nos restantes ensaios verificou-se o contrário, sugerindo uma menor estabilidade dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante nas condições intestinais. A atividade antioxidante detetada, quer na fase gástrica, quer na fase intestinal, sugere que as maçãs possam desempenhar um papel importante na desactivação de espécies reactivas de oxigénio que se formem nessas zonas do aparelho digestivo.

Em termos futuros seria de grande interesse fazer a determinação, por HPLC, do perfil em compostos fenólicos das variedades estudadas de modo a tentar estabelecer relações entre as atividades biológicas e a presença ou ausência de compostos específicos, tentando identificar os principais compostos bioativos presentes nas diferentes variedades e estudando de forma individual o modo como são afetados pela simulação da digestão. Seria também de todo o interesse avaliar a forma como esta simulação pode afetar outras atividades biológicas, tais como, por exemplo, a atividade antimutagénica contra mutagénios diretos e pré-mutagénios, atividade antiinflamatória ou atividade antibacteriana.

O estudo da biodisponibilidade dos componentes bioativos das diferentes variedades de maçã estudadas após o processo de digestão gastrointestinal, constitui um importante passo para a extrapolação dos efeitos benéficos observados *in vitro* para a situação *in vivo*. Contudo, para poder constituir uma melhor aproximação este estudo deveria ser complementado com estudos de bioassimilação, utilizando a linha celular de enterócitos humanos Caco-2. Esta linha celular expressa os transportadores normalmente presentes nos enterócitos e constitui um bom sistema celular para realizar estudos de absorção intestinal.

## Referências Bibliográficas

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., Aguiar, R. M. (2010) Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33(10), 2202–2210.

Antunes, R.B. (2012). Avaliação do efeito da digestão *in vitro* na capacidade antioxidante de infusões medicinais: flor de Camomila e flor de Laranjeira. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, disponível em [http://run.unl.pt/bitstream/10362/9068/1/Antunes\\_2012.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/9068/1/Antunes_2012.pdf).

Anzuategui, L.S.Y., (2009). Análise *in vitro* da atividade antioxidante do suco e extrato de maçã em células RINm5f submetidas a diferentes condições de estresse oxidativo. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, disponível em [http://www.bicentede.uepg.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=372](http://www.bicentede.uepg.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=372).

Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S.E., (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, pp 7970 - 7981.

Aprikian, O., Levrat-Verny, M., Besson, C., Busserolles, J., Remesy, C., & Demigne, C., (2001). Apple favorably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol fed rats. *Food Chemistry*, 75, 445-452.

Arçari, D.P., (2009). Efeitos biológicos do consumo de chá-mate (*Ilex paraguariensis*) frente à obesidade em camundongos. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6138/tde-02032009-094433/pt-br.php>.

Balbi, S.F., (2009). Estudo do impacto de *stress* abiótico controlado na componente bioactiva de polpas de maçã. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, disponível em <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1989/1/Tese%20Vers%C3%A3o%20Final.pdf>

Barros, Z.M.P., (2011). Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidantes para enriquecimento de suco pronto. Dissertação de mestrado apresentado à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – Piracicaba, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-22112011-143150/pt-br.php>.

Barros, L.; Carvalho, A.M.; Morais, J.M.; Ferreira, I. C.F.R., (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, pp 247 – 254.

Bergamaschi, K.B., (2010). Capacidade antioxidante composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. Dissertação de mestrado apresentado à escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-10022011-144122/pt-br.php>.

Bértolo, D. F. Q., (2011). Aplicação de Quitosano na Redução do Escurecimento Enzimático em Sumo de Maçã Não Pasteurizado (Estabilizado por Hiperpressão). Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Lisboa, disponível em [http://run.unl.pt/bitstream/10362/6718/1/Bertolo\\_2011.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/6718/1/Bertolo_2011.pdf).

Bhatt, A.; Patel,V., (2013). Antioxidant activity of garlic using conventional extraction and *in vitro* gastrointestinal digestion. *Free Radicals and Antioxidants*, 3, pp 30-34.

Boyer,J. & Liu, R.H., (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3(5), 1-15.

Bouayed, J.; Hoffmann,L.; Bohn, T., (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Journal of Food Chemistry*, 128, pp 14-20.

Buonocore, G., Perrone, S., & Tataranno, M. L., (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), 186-190.

Briones-Labarca,V.; Venegas-Cubillos, G.; Ortiz-Portilla, S.; Chacana-Ojeda, M.; Maureira; M., (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128 pp 520 – 529.

Caetano, A.C. S., (2009). Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia Emarginata* D.C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa do óleo de soja. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, disponível em [http://200.17.137.108/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=661](http://200.17.137.108/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=661).

Chobot,V., (2010). Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, pp 2088-2094.

Chung,F. L., Chen, H. J. C., & Nath, R. G., (1996). Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, 17(10), 2105-2111.

Feliciano, E. P.; Antunes, C.; Ramos, A.; Serra, A. T.; Figueira, M. E.; Duarte, C., M. M.; Carvalho, A. & Bronze, M. R., (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties

from Portugal. Part 1 – Nutritional, phytochemical and sensory Evaluation. *Journal of Functional Foods*, 2, 35-45.

Feliciano, E., (2013). A maçã na alimentação. Fundação Portuguesa de Cardiologia, disponível em <http://www.maca.pt/custompages/showpage.aspx?pageid=9df070c3-34fc-4e22-93ed-51fff7b2fb5b&m=b32>.

Fernandez-Panchon, M.S.; Villano, D.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parrilla, D.; (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 48, n 7, p. 649-671.

Ferreira, J., (1994). *Variedades de Macieira*. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Lisboa. 6 – 59.

Filgueiras, C.T.; Soares, A.L.; Shimokomaki, M., Ida, E.I.; (2009). Avaliação da Atividade Antioxidante do Ácido Fítico de Germe de Milho. *Química Nova*, 32(7), pp 1787-1791.

Gaboardi, M.; (2013). Anatomia e Fisiologia do Sistema Digestório. <http://freepdfz.com/pdf/anatomia-e-fisiologia-sistema-digestrio-marilia-gaboardi-33351836.html>.

Galvano F., (2008). Protocatechuic acid: The missing human cyanidins' metabolite. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, pp 386 – 387.

Giori, F. P., (2010). Adaptação de metodologia de digestão in vitro e determinação da bioacessibilidade in vitro de  $\beta$ -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, disponível em [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=181869](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=181869), acedido em Agosto de 2013.

Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C., (2000). Total antioxidante capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Biology & Medicine*, v.29, n.11, p.1106-1114.

Globalagrimar, (2013). Ficha de internacionalização da maçã. Gabinete de planeamento e políticas, Portugal, disponível em <http://www.gpp.pt/GlobalAgriMar/informacao/Docs/Produtos/Fichas/2012S2MacaFI.pdf>.

Gomez-Ruiz, J.A.; Leake, D.S.; Ames, J.M., (2007). In vitro antioxidante activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.55, n.17, p. 6962 -6969.

Gonçalves, A.E.S.S., (2008). Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. Dissertação de mestrado



apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-28012009-161811/pt-br.php>.

Gonçalves, A.E.S.S., (2012). Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dúbia* McVaugh): caracterização e atividade biológica. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-08032013-165045/pt-br.php>.

Hampson, C. R. & Kemp, H., (2003). Characteristics of important commercial apples cultivares, *In: Ferree, D. C. & Warrington, I. J. (Eds.) Apples, botany, production and uses*. CABI Publishers, Cambridge, MA, EUA, 61-90.

Henríquez, C.; Speisky, H.; Chiffelle, I.; Valenzuela, T.; Araya, M.; Simpson, R.; Almonacid, S., (2010). Development of an ingredient containing apple peel, as a source of polyphenols and dietary. *Journal of Food Science*, Chicago, n. 6, v.75, p.H172 – H181.

Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., Anson, H., Eisenhour, D., (2006). *Integrated Principles of Zoology*. 13ª Edição, McGraw-Hill Companies, New-York, E.U.A., pp. 58-59, 694-702, 706.

Huang, D.; Prior, R.L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.1841 – 1856.

Hur, S. J.; Lim, B. O.; Decker, E. A.; McClements, D. J., (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.

INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) (2013). Maçã com casca, disponível em <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS662>, acessado a: 21/07/2013.

Jardini, F.A., (2010). Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Punica granatum*, L) – avaliação *in vivo* e em cultura de células. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-31052010-150831/pt-br.php>.

Koşar, M.; Göger, F.; Başer, K.H.C., (2008). *In Vitro* Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp 2369 - 2374.

Landete J. M., (2012). Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 936-948.

Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Cyz, M., Martin- Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. & Trakhtenberg, S., (2003). Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(19), 5780-5785.

Lidon, F., Silvestre, M.M., (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. 1ª Edição, Escolar Editora, Lisboa, Portugal, pp.190-193, 307-343.

Lima, K.S.P., (2011). Avaliação da Actividade Antioxidante e Antimutagénica em Diferentes Infusões Medicinais: Barbas de milho, Carqueja, dente de Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, disponível em [http://run.unl.pt/bitstream/10362/7863/1/Lima\\_2011.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/7863/1/Lima_2011.pdf).

Lima, A., (2008). Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-30042008-090010/pt-br.php>.

Lu, Y. & Foo, L. Y., (2000). Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 68, 81-85.

Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), pp 1-19.

Manach, C.; Scalbert, A., Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.79, n.5, p.727-747.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A. e Rémésy, C., (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(suppl), pp 230S-242S.

Martins, I., (2007) Tabela da composição de alimentos. Instituto nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 355 p.

Martins, F.S., (2012). Desenvolvimento de um novo método de produção de sumo de maçã visando incrementar o teor em polifenóis e diminuir o escurecimento. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, disponível em [http://run.unl.pt/bitstream/10362/9860/1/Martins\\_2012.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/9860/1/Martins_2012.pdf).

Matsumoto, R.L.T., (2008). Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*). Dissertação de mestrado apresentada a Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São

Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6133/tde-21072008-150005/pt-br.php>.

McGuire, H.; Fan, W. L. & Svetkey, L. P., (2005). Dietary Approaches to Hypertension Management, The DASH Studies. *In Hypertension: A Companion to Brenner and Rector's The Kidney*, 2ª Ed. Elsevier Inc.

Meoti, F.C. ,(2007). Análise dos mecanismos de ação antinociceptiva e antiinflamatória do flavonóide miricitrina: estudos *in vivo* e *in vitro*. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicologia, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, disponível em [http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=1660](http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1660).

Migliore L. e Coppedè, F., (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research*, 674, pp 73–84.

Monn, J.K., Shibamoto, T., (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, pp 1655 - 1666.

Nakamura,S., Kato, A., Kobayashi, K., (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), pp 2033-2037.

Nascimento, R.J., (2010). Potencial antioxidante de resíduo agroindustrial de goiaba. Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pernambuco, disponível em [http://www.pgcta.ufpe.br/files/dissertacoes/2010/rosilda\\_do\\_nascimento.pdf](http://www.pgcta.ufpe.br/files/dissertacoes/2010/rosilda_do_nascimento.pdf).

Oldoni, T.L.C., (2010). Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais. Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64135/tde-22062011-112040/pt-br.php>.

Oliveira, C. M. M. S., ( 2007). Transpiração. Apontamentos da disciplina de Tecnologias pós-colheita, ISA, UTL. Lisboa.

O'Rourke, D., (2003). World Production, Trade, Consumption and Economic Outlook for apples. [autor do livro] D.C. Ferree e I.J. Warrington. *Apples, Botany, Production and Uses*.Cambridge : CABI Publishing.

Pantelidis, G.E.; Vasilakakis, M.; Manganaris, G.A. e Diamantidis, G.R., (2007) Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102, pp 777–783.

Pazzini, C.E.F., (2012). Efeito antioxidante do vinho Tannat produzido em Itaqui (RS) sobre o estresse oxidativo em modelo de hiperglicemia *in vitro*. Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, disponível em <http://cursos.unipampa.edu.br/cursos/ppgbioq/files/2012/04/Efeito-antioxidante-do-vinho-Tannat-produzido-em-Itaqui-RS-sobre-o-estresse-oxidativo-em-modelo-de-hiperglicemia-in-vitro.pdf>.

Peng, Y.; Liu, F.; Peng, Y.; Ye, J., (2005). Determination of polyphenols in apple juice and cider by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, n. 92, p. 169-175.

Peschel, W.; Sánchez-Rabaneda, F.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Gartzia, I.; Jlménez, D.; Lamuela-Raventós, R.; Buxaderas, S.; Codina, C., (2005). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, v. 97, p. 137-150.

Pietta, P.G.,(2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*,v.63, p. 1035 -1042.

Prado, A., (2009). Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais. Dissertação de mestrado apresentado à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-09112009-135846/pt-br.php>.

Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K., (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.

Ramful, D., Baborun, T., Bourdon, E.; Tarnus, E., Aruoma, O.I., (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritan citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 278, pp 75-87.

Ratnam, D.V.; Ankola, D.D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D.K. e Kumar, M.N.V.R., (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, pp 189–207.

Rasteiro, E.M.N., (2012). Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagênicas de diferentes cultivares de *Vaccinium* spp, do grupo “Southern Highbush”, produzidas em Portugal. Dissertação de mestrado apresentado à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, disponível em [http://run.unl.pt/bitstream/10362/7707/1/Rasteiro\\_2012.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/7707/1/Rasteiro_2012.pdf).

Ribeiro, E. T. S., (2007). Emprego de técnicas de extração a alta e baixa pressão para obtenção de polifenóis antioxidantes do subproduto agroindustrial de maçã. Dissertação de mestrado apresentada ao Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, disponível em <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/90218/242818.pdf?sequence=1>.

Rice-Evans, (2004). Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism and Bioactivity. *Free Radical Biology and Medicine*, v.36, n.7, p.827 - 828.

Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P. & Glover, W., (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401–436.

Ruel, G. e Couillard, C., (2007) Evidences of the cardioprotective potential of fruits: The case of cranberries. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, pp 692–701.

Santana, A.I.E., (2012). Aplicação de revestimentos comestíveis à base de quitina desacetilada de subprodutos da indústria de pescado em maçã Fuji de IV gama. ". Dissertação de mestrado apresentado á Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche do Instituto Politécnico de Leiria, disponível em [https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/748/1/Mestrado%20QSA alimentar\\_Analsabel\\_Santana.pdf](https://iconline.ipleiria.pt/bitstream/10400.8/748/1/Mestrado%20QSA alimentar_Analsabel_Santana.pdf).

Santos, P.S., (2009). Aplicação da espectroscopia de infravermelho próximo na avaliação de alguns atributos de qualidade em pêra “Rocha” e maçã “Gala”. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, disponível em <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/1057>.

Santos, C.A.F., (2011). Desenvolvimento de um produto: “Fruta com iogurte”. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, disponível em [http://run.unl.pt/bitstream/10362/6567/1/Santos\\_2011.pdf](http://run.unl.pt/bitstream/10362/6567/1/Santos_2011.pdf).

Serra, A.T., Matias, A.A., Frade, R.F.M., Duarte, R.O.; Feliciano, R.P.; Bronze, M.R.; Figueira, M.E.; Carvalho, A.; Duarte, C.M.M., (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 – Antioxidant and antiproliferative activities *Journal of Functional Foods*, 2, pp 46-53.

Shahidi, F.; Finley, J.W., (2001). Omega-3 fatty acids: Chemistry, nutrition and health effects. ACS Symposium Series 788. Washington, D.c: American Chemistry Society.

Soares, S.E., (2002). Ácidos fenólicos como antioxidants. *Revista de Nutrição*, Campinas, V. 15, n.1, p.71-81.

Sorg, O., (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327(7), 649-662.

Teixeira, F.C.; Silveira, E.F.; Beira, F.T.A.; Del Pino, F.A.B.; Braganhol, E.; Vizzotto, M., (2012). Compostos antioxidantes de extrato de maçã, cultivar gala, promovem diminuição da viabilidade de melanoma em cultura e induzem morte celular via processo de necrose. Artigo em Anais de congresso do XIV ENPOS - Encontro de Pós-Graduação, pela Universidade Federal de Pelotas, disponível em <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/busca?b=pc&id=>

940798&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22SILVEIRA,%20E.%20F.%20da%22&qFacets=autoria:%22SILVEIRA,%20E.%20F.%20da%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1.

Tessmer, M.A., (2009). Características anatômicas e físico-químicas de frutos de macieira (*Mallus domestica* Borkh.) e sua relação com a lenticelose. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo – Piracicaba, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-24022010-152218/pt-br.php>.

Thiemann, O., (2013). Apostila de Fisiologia, Sistema digestivo. Laboratório de Biologia do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, disponível em <http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/apostila/apost-fisiol-parte4.pdf>.

Tiveron, A. P., (2010). Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação de mestrado apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-20102010-101541/pt-br.php>.

Tognon, A.L., (2012). Quantificação e avaliação da bioacessibilidade *in vitro* de micro e macroelementos em frutas, hortaliças e cereais. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-14052012-211233/pt-br.php>

Tomás-Barberán, F.A.; Ferreres, F., & Gil, M. I., (2000). Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Journal of Studies in Natural Products Chemistry*. 23, 739-795.

Valentão, P.; Fernandes, E.; Carvalho, F.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Bastos, M.L., (2001). Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by Its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp 3476 - 3479.

Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi M, Chatterjee, A., Vinson, J.A. e Bagchi, D., (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51, pp 675–683.

Zardo, D.M., (2007). Avaliação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em maçãs e seus produtos. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* da Universidade Estadual da Ponta Grossa, disponível [http://www.bicen-tede.uepg.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=454](http://www.bicen-tede.uepg.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=454).

Wang, H.; Cao, G.; e Prior, R.L., (1996) Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, pp 701 – 705.

Williamson, G. e Manach, C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (suppl), pp 243S–245S.

Wills, R.; McGlasson, B., Graham, D. & Joyce, D., (2007). *Postharvest*, 5<sup>th</sup> edition, CABI, Australia, 227pp.

Wolfe, K.; Wu, X.; Liu, R.H., (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Washington. Vol.51, p.609 - 614.